Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H. A. Hirsch

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WIRKUNG EINES BENZODIAZEPINDERIVATES DIAZEPAM AUF DIE FREISETZUNG VON FOLLIKELSTIMULIERENDEM UND LUTEINISIERENDEM HORMON AUS DER HYPOPHYSE

INAUGURAL–DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Klaus Dieter Stock
aus Einöd

1978

Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H. A. Hirsch

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WIRKUNG EINES BENZODIAZEPINDERIVATES DIAZEPAM AUF DIE FREISETZUNG VON FOLLIKELSTIMULIERENDEM UND LUTEINISIERENDEM HORMON AUS DER HYPOPHYSE

INAUGURAL–DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Klaus Dieter Stock
aus Einöd

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. H.–E. Hoffmeister
1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Heller
(Professor Dr. H. A. Hirsch)
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. K. Hayduk

Geschrieben und gedruckt bei H.–J. Köhler, 7400 Tübingen, Neue Straße 11

Meinen Eltern gewidmet

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. S. Heller für die Formulierung des Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes. Dank schulde ich auch Herrn Kurt und Walter Eberle, Herrn Lorenz, Frl. Öhme, Frl. Schoch und Frl. Straub, die mich bei der Durchführung der Versuche unterstützten.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A	EINLEITUNG	1
I	Übersicht über die Regulation der weiblichen Gonadenfunktion	1
II	Beeinflussung des Hypophysenvorderlappens durch Hypothalamus und übergeordnete Zentren	2
	1. Morphologisches Substrat der zentralen Regulation	2
	2. Gesetzmäßigkeiten der Steuerungsvorgänge zwischen Hypophyse und Hypothalamus	6
	3. Rezeptoren	11
III	Der weibliche Zyklus als Funktion der Wechselwirkungen im Regelkreis	13
IV	Ausgangspunkt für den experimentellen Teil der Arbeit	14
V	Diazepam als Faktor für den Gonadotropin-Release	20
B	FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	24
C	MATERIAL UND METHODEN	25
I	Nachweis der Gonadotropin-Releasing-Aktivität nach einer Modifikation der Methode von RAMIREZ und McCANN (1963)	25
II	FSH-Nachweis nach STEELMAN und POHLEY (1953)	26
III	LH-Nachweis nach PARLOW, A.F. (1958)	28
IV	Aufarbeitung der Hypophysen nach einer Modifikation der Methode von PARLOW, A.F. (1964)	31
V	Statistische Auswertung der Ergebnisse	32

Seite

VI Bestimmung der FSH- und LH-Konzentrationen mit Hilfe des Radio-Immuno-Assay (RIA) 33

1. Prinzip des Radio-Immuno-Assay 33

2. Durchführung des Radio-Immuno-Assay 34

a) Hormonmarkierung 34

b) Erstellen einer Eichkurve 38

c) Bestimmung des FSH- bzw. LH-Gehalts der Testseren 46

d) Bestimmung des FSH- bzw. LH-Gehalts der Hypophysen 46

3. Materialien 47

D ERGEBNISSE 49

E DISKUSSION 103

F ZUSAMMENFASSUNG 116

G LITERATURVERZEICHNIS 118

LEBENSLAUF

ABKÜRZUNGEN

B_o	:	Bindung ohne Antigen
B_x	:	Bindung mit Antigen
BSA	:	Bovine Serum Albumin = Rinderserum-albumin
FSH	:	Follikel stimulierendes Hormon
FSH-RH	:	FSH Releasing Hormon = FSH- Releasing Factor
GABA	:	Gammaaminobuttersäure
HCG	:	Human Chorion Gonadotropin
HVL	:	Hypophysenvorderlappen
LD 50	:	Dosis, bei welcher 50% der Individuen eines Kollektivs getötet werden.
LH	:	Luteinisierendes Hormon
LH-RH	:	LH Releasing Hormon = LH Releasing Factor
LTH	:	Luteotropes Hormon = Prolaktin
p.i.	:	post injectionem
mg OG/100 g TG	:	Verhältnis Ovargewicht zu Tiergewicht = biologische FSH-Aktivität
OAAD	:	Ovarascorbinsäureverarmung = biologische LH-Aktivität
PBS	:	Phosphate Buffer Solution = Phosphatpufferlösung
RF	:	Releasing Factor = Releasing Hormon

A EINLEITUNG

I Übersicht über die Regulation der weiblichen Gonadenfunktion

Die Genitalorgane, wie Uterus, Eileiter, Vagina, Vulva und Mammae, werden durch die Ovarialhormone stimuliert, wobei die Bildung und Ausschüttung dieser Hormone zyklischen Schwankungen unterworfen ist. In der Follikelphase werden vorwiegend Östrogene, in der Lutealphase überwiegend Progesteron gebildet.

Follikelphase und Lutealphase sind abhängig von der Wirkung hypophysärer Hormone, sogenannter Gonadotropine (FSH und LH).

Die Bedeutung des dritten Gonadotropins, LTH, für die einzelnen Zyklusphasen ist noch nicht genau bekannt.

Das Follikel stimulierende Hormon bewirkt die Entwicklung eines Follikels bis zum Stadium des Tertiärfollikels. Für sich allein hat FSH keine inkretorische Wirkung. Zusammen mit dem luteinisierenden Hormon fördert FSH das Follikelwachstum bis zur Sprungreife und die Ovulation, zusammen mit LTH die Bildung des Corpus luteum. LH allein stimuliert die Steroidbiosynthese im Gelbkörper.

Follikelreifung, Eisprung, Gelbkörperbildung und Steroidbiosynthese ergeben sich aus einem zeitlich und quantitativ genau abgestimmten Verhältnis der beiden Gonadotropine FSH und LH untereinander. Die Synthese und Ausschüttung von FSH und LH aus dem Hypophysenvorderlappen kommt einerseits durch die Inkretion von sogenannten Releasing-Faktoren aus dem Hypothalamus, andererseits durch die Rückkoppelungswirkung der Steroide des Ovariums zustande.

II Beeinflussung des Hypophysenvorderlappens durch Hypothalamus und übergeordnete Zentren

1. Morphologisches Substrat der zentralen Regulation

Zwischen Hypothalamus und Hypophysenvorderlappen bestehen keine Nervenverbindungen. Dennoch kann man durch Zerstörung oder Stimulation bestimmter Zwischenhirnareale bzw. Zentren der Temporalregion die FSH- und LH-Inkretion der Hypophyse stimulieren oder hemmen.

MARTINI et al. (1969) zerstörten die Nuclei arcuati und ventromediales der Area suprachiasmatica und stellten einen Ausfall der hypophysären LH-Ausschüttung fest. Die Zerstörung der Area paraventricularis dagegen hatte den Verlust der FSH-Ausschüttung zur Folge.

FRASCHINI et al. (1968) konnten bei Läsionen der Nuclei ventromediales der Area suprachiasmatica wie auch der Nuclei arcuati eine Konzentrationsabnahme des LRF und bei Läsionen der Nuclei paraventriculares eine Konzentrationsabnahme des FRF an der Eminentia mediana feststellen.

Wie Versuche von SCHNEIDER und McCANN zeigten (1970), die ein Präparat aus Eminentia mediana, Hypophysenstiel und Adenohypophyse in einem Nährmedium aus Dopamin, Serotonin, Adrenalin und Noradrenalin inkubierten, sind die Fortsätze zur Eminentia mediana dopaminerg, da nur bei Dopamin ein FSH- und LH-Release stattfindet. Wenn in dem Präparat Hypothalamus und Hypophysenstiel fehlen, vermag Dopamin allein keinen Release zu erzeugen. Man nimmt daher an, daß der RF an der Eminentia mediana durch dopaminerge Neuren freigesetzt wird. Der Releasing-Faktor und Dopamin kommen beide im gleichen Neuron vor. Die Freisetzung des Dopamins aus seinen Granula bewirkt die Freisetzung des Releasingfaktors.

Bei der Zerstörung der Nuclei arcuati und ventromediales, bzw. der Nuclei paraventriculares, blieb die von HARRIS, G.W. (1952) gefor-

derte Integrität des Pfortadersystems gewahrt. Schon vorher hatten WESTMANN und JACOBSON (1938) den Hypophysenstiel durchtrennt, worauf es zur Atrophie der Ovarien gekommen war. Mittels Tintein-jektionen stellten GREEN und HARRIS (1947) fest, daß das Blut in dem von POPA und FIELDING (1931) erstmals beschriebenen Portalgefäß-system von der Eminentia mediana zum Hypophysenvorderlappen fließt.

Durch Stimulationsversuche ließ sich zeigen, daß man bei der LH-Ab-gabe zwischen einer zyklischen und einer basalen LH-Inkretion unter-scheiden muß. BARRACLOUGH und GORSKI (1961), DESCLIN et al. (1962) und FLERKO und BARDOS (1961) lokalisierten die basale LH-Inkretion in das Gebiet des Nucleus arcuatus und in die ventralen An-teile des Nucleus ventromedialis und die zyklische Abgabe von LH in die präoptische suprachiasmatische Region. Die basale LH-Inkretion vermag zwar die Östrogenbiosynthese anzuregen, nicht aber die Ovu-lation auszulösen. HIROI et al. (1965) bzw. EVERETT und QUINN (1966) lieferten weitere Beweise für den Dualismus der basalen und zyklischen LH-Inkretion. HIROI et al. stellte nach Stimulation des Nucleus ventromedialis beim Kaninchen einen Anstieg der Östrogen- und Pregnandiolausscheidung fest. EVERETT und QUINN konnten nach Aktivierung präoptischer Kerngebiete bei der Ratte eine Ovulation be-obachten. Zur Auslösung der Ovulation ist jedoch eine Stimulation der entsprechenden Kernregion über einen bestimmten Zeitraum erforder-lich (EVERETT 1965).

Im extrathalamischen Bereich konnten Hirnareale nachgewiesen wer-den, welche die Sexualität hemmen. Nach Elektrokoagulation der Nu-clei amygdalei und des vorderen Hypothalamus kommt es bei juvenilen Ratten zur Pubertas praecox (ELWERS und CRITCHLOW, 1960). Durch gezielte Läsionen in den basolateralen, kortikalen und medialen Ge-bieten des Nucleus amygdaleus konnten ELEFTHERIOU et al. (1970) bei der männlichen Weißfußmaus (peromyscus maniculatus) nachwei-sen, daß der LH-Gehalt im Plasma und in der Hypophyse nach Zer-

störung des basolateralen und kortikalen, nicht aber des medialen Gebietes, ansteigt. Aber auch im Hypothalamus sieg der LRF-Gehalt bei Zerstörung der basolateralen und kortikalen Teile des Nucleus amygdaleus an. In der Eminentia mediana fiel er dagegen ab. Nach Koagulation des medialen Anteils des Nucleus amygdaleus verminderte sich der LRF-Gehalt des Hypothalamus.

SZENTAGOTHAI et al. (1968) wiesen histologisch und histochemisch afferente Nervenfasern von der Formatio reticularis und vom limbischen System zum Hypothalamus nach. Das limbische System und die Formatio reticularis sind an der Regulation und Übertragung der Impulse von der Cortex zu den Zentren des Hypothalamus beteiligt (AKERT, 1964).

VELASCO und TALEISNIK (1971) untersuchten die Beziehung zwischen dem limbischen System und dem Hypothalamus, speziell zwischen Nucleus amygdaleus und Hippocampus einerseits und der präoptischen Region des Hypothalamus andererseits. Die Stria terminalis, die vom Nucleus amygdaleus ausgeht (HEINER und NAUTA, 1969), und der mediale kortikohypothalamische Trakt, welcher vom Hippocampus kommt (NAUTA 1956, RAISMAN, COWAN und POWELL, 1966) laufen beide durch die präoptische Region zum Infundibulum. Diese limbischen Efferenzen können unterbrochen werden bevor sie die präoptische Region erreichen. Da die akute Unterbrechung der Stria terminalis oder die Zerstörung des Amygdaloids zur Zeit des Proöstrus nicht zu der erwarteten Ovulation führte, vermutet man einen fördernden Einfluß dieser Strukturen auf die Ovulation. Im Gegensatz dazu, änderte die Unterbrechung des kortiko-hypothalamischen Traktes nichts an der spontanen ovulatorischen Antwort. Die Untersuchungsergebnisse von VELASCO und TALEISNIK (1971) stützen die Vermutung, daß die mittlere präoptische Region neurale Elemente enthält, die fähig sind Stimuli auszusenden, welche eine ovulatorische Gonadotropinfreisetzung auslösen.

Die zwei wichtigsten efferenten Bahnen vom Hippocampus, die Fimbrien und die dorsale Fornix, wurden 1966 von RAISMAN et al. beschrieben. Nur bei Zerstörung der Fimbrien kam es zur Zerstörung des kortiko-hypothalamischen Trakts, nicht bei Unterbrechung der dorsalen Fornix.

Da die Unterbrechung der amygdaloid-hippocampalen Einflüsse die LH-Plasmaspiegel nach Ovariektomie nicht beeinflußte, kann man annehmen, daß die limbischen Strukturen die tonische LH-Ausschüttung nicht beeinflussen.

Diese Ergebnisse stimmen mit der Vorstellung überein, daß der Auslöser für den ovulatorischen Mechanismus der Gonadotropinausschüttung in der präoptischen Region liegt. Das Corpus amygdaleum und der Hippocampus, welche Einflüsse von gegensätzlicher Natur zur Geltung bringen, bilden einen Teil eines modulierenden Systems, welches die Funktion des primär stimulierenden präoptisch-hypothalamischen Gebietes reguliert. Nach Ausschaltung der modulierenden limbischen Einflüsse bleibt die Funktion der präoptischen Region bestehen. Diese Vorstellung paßt zu der Ansicht von GLOOR (1956), daß das limbische System nicht grundsätzlich die Funktionen integriert, zu deren Beeinflussung es fähig ist, sondern eher als Modulator funktioneller Muster wirkt, welche auf der Höhe des Hypothalamus und des Tegmentum bestehen.

Möglicherweise übt die Epiphyse einen spezifischen Effekt auf die Funktion des Hypophysenvorderlappen aus. WURTMAN et al. (1961) stellten bei weiblichen Ratten nach Entfernung der Epiphyse eine Ovargewichtszunahme fest. BINDONI und RAFFAELE (1968) fanden nach Epiphysenexstirpation eine erhöhte Mitoserate in der Hypophyse. Sowohl durch synthetisches Arginin-Vasotocin als auch durch Pinealargininvasotocin konnten PAVEL und PETRESCU (1966) die Wirkung des Stutenserumgonadotropins auf den Uterus der Maus hemmen. SOFFER et al. (1965) fanden, daß Rinderpinealextrakt die Wirkung von menschlichem Menopausen- und Choriongonadotropin inhibiert.

Durch die Implantation von Pinealgewebe oder Melatonin in die Eminentia mediana wird sowohl der LH-Gehalt der Hypophyse als auch der des Serums gesenkt. Die Implantation in die Hypophyse zeigt keine Wirkung.

Nach elektrischer Stimulation der Eminentia mediana bei ovariektomierten, östrogenbehandelten Schafen kam es zum signifikanten Anstieg der Plasma-LH-Spiegel (MALVEN 1975). Bei unbehandelten Kastraten fanden in Intervallen von etwa einer Stunde spontane LH-Entleerungen (LH-Rhythmus) statt. Wenn Stimulationen der Eminentia mediana fünf bis fünfzehn Minuten nach einer spontanen Entleerung stattfanden, kam es zu erhöhten LH-Spiegel, ebenso wie nach Stimulation der Eminentia mediana zu anderen Zeitpunkten oder wie nach spontanen Entleerungen. Diese Tatsachen ließen keineswegs eine hypophysäre Refraktärität gegenüber der Eminentia - mediana - Stimulation und auch gegenüber dem endogenen Releasingfaktor vermuten. Deshalb dachte man an neurale Mechanismen im Bezug auf den rhythmischen Release von LRF.

Eine Chlorpromazinbehandlung konnte die LH-Ausschüttung nicht in erkennbarer Weise beeinträchtigen. Dies läßt vermuten, daß eine synaptische Übertragung, die durch Chlorpromazin blockiert wird, für die Anregung einer LH-Ausschüttung nicht erforderlich ist. MALVEN nahm daher an, daß die LRF produzierenden Neurone direkt aktiviert wurden.

2. Gesetzmäßigkeiten der Steuerungsvorgänge zwischen Hypophyse und Hypothalamus

NIKITOWITCH-WINER und EVERETT (1958) pflanzten Rattenhypophysen in die vordere Augenkammer und unter die Nierenkapsel. Daraufhin blieb der Sexualzyklus aus und die LTH-Ausschüttung nahm zu. Nach anschließender Reimplantation der Hypophyse in die Sella turcica stellte sich wieder ein regelmäßiger Zyklus ein. Die Zeitspanne zwi-

schen Reimplantation und erneutem Auftreten des Zyklus war jedoch zu kurz, als daß in ihr eine Regeneration von Nervenfasern hätte stattfinden können. Da die Gefäß- und Nervenversorgung der Hypophyse vollständig unterbrochen war, nahm man einen neurohumoralen Übertragungsmechanismus an. WATSON, KRULICH und McCANN (1971) untersuchten die Wirkung von ungereinigtem Rattenhypothalamusextrakt auf die Serumgonadotropinspiegel bei normalen und orchidektomierten Ratten. Der Serum-LH- und FSH-Spiegel wurde unmittelbar vor und acht Minuten nach einer intravenösen Injektion von Hypothalamusextrakt bestimmt. Sowohl bei normalen als auch bei frisch und bei länger kastrierten Ratten, denen man Hypothalamusextrakte spritzte, fand sich ein signifikant erhöhter Serum-LH-Spiegel, wohingegen Hirnrindenextrakte die Serum-LH-Spiegel nicht beeinflußten.

WAKABAYASHI, ANTUNES-RODRIGUES, TAMAOKI und McCANN (1972) inkubierten Rattenadenohypophysen alternativ mit einem Schafshypothalamusextrakt (HE) und dessen Ultrafiltrat (HEUF). Das Filtrat bewirkte einen dosisabhängigen LH-Release, änderte aber nicht den Gesamt-LH-Gehalt des Systems.

Die Steuerung der hypophysären Synthese und Ausschüttung von Gonadotropinen erfolgt durch sogenannte Releasing- und Inhibiting-Faktoren. In Analogie zu anderen hypophysären Hormonen fordert man auch für die Gonadotropine (FSH, LH, LTH) drei hypothalamische Faktoren FRF, LRF und PIF.

Im Gegensatz zu den Releasing-Faktoren von FSH und LH (FRF und LRF) spricht man bei LTH (Prolaktin) von einem inhibierenden Faktor PIF. Wie die Versuche von NIKITOWITCH und WINER (1958) zeigten, kommt es nach Verpflanzung der Hypophyse unter die Nierenkapsel zu einer vermehrten LTH-Produktion. Eine vermehrte LTH-Abgabe konnten auch FLAMENT-DURANT (1964) und FLERKO und BARDOSZ (1961) nach Elektrokoagulation des Gebietes dorsolateral

vom Nucleus paraventricularis feststellen. Daraus geht hervor, daß die hypophysäre Bildung und Ausschüttung von LTH durch den hypothalamischen PIF gehemmt wird.

Die hypothalamische Kontrolle der Gonadotropinausschüttung wird durch hypothalamische Peptide vermittelt. Es wurde sowohl über eine FSH- als auch eine LH-Releasingaktivität hypothalamische Extrakte berichtet (McCANN, 1962; IGARASHI, NALLAR und McCANN, 1964). Die LH-Releasingaktivität wurde gereinigt und von anderen hypothalamischen Faktoren getrennt (DHARIWAL, ANTUNES-RODRIGUES und McCANN, 1965). Die beiden hitzestabilen Releasingfaktoren FRF und LRF konnten bisher nicht getrennt werden (RAMIREZ et al. 1964; SCHALLY et al. 1966; FAWCETT et al. 1968).

WHITE (1970) nahm daher an, daß möglicherweise nur ein einziges Peptid für den Release von FSH und LH verantwortlich ist. 1971 gelang es SCHALLY et al. ein synthetisches Dekapeptid herzustellen, welches die gleichen biologischen Eigenschaften besitzt wie eine Substanz, die man aus Schweinehypothalami extrahiert hatte.

SCHALLY, A.V., ARIMURA, A., KASTIN, A.j., MATSUO, H., BABA, Y., REDDING, T.W., NAIR, R.M.G. and DEBELJUK, L. (1971 a); SCHALLY, A.V., BABA, Y., REDDING, T.W., MATSUO, H. and ARIMURA, A. (1971); SCHALLY, A.V., NAIR, R.M.G., REDDING, T.W. and ARIMURA, A. (1971b).

Es handelt sich dabei um ein Dekapeptid mit der Sequenz:

Pyroglu-His-Try-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2

Injiziert man dieses synthetische Dekapeptid (z.B. 25 μ g) einer zyklusgesunden Frau, so erhält man nach fünf bis zehn Minuten einen steilen Anstieg des Serum-LH und einen gegenüber dem LH verzögerten Anstieg des Serum-FSH.

Im Gegensatz zu WHITE et al. (1970) postulieren McCANN, OJEDA, FAWCETT und KRULICH (1974) zwei hypothalamische Releasingfak-

toren, da die FSH-Ausschüttung und die LH-Ausschüttung getrennt hervorgerufen werden können, wie Stimulierungs- und Zerstörungsversuche zeigten. HELLER, S. und SCHLUMBERGER, H.D. (1971) und HELLER, S. (1972) stellten fest, daß dieses synthetische Dekapeptid Unterschiede zum menschlichen LH-FSH-RF aufweist.

Nach Verabreichung eines Schafshypothalamusextraktes (OHE), eines synthetischen gonadotrophen Releasingfaktors und von Dibutyryl-cyclo-Adenosinmonophosphat konnten GROOM und BOYNS (1973) eine Freisetzung von LH und FSH in menschlichen foetalen Adenohypophysenkulturen beobachten. Dabei war die LH-Ausschüttung stärker als die FSH-Ausschüttung. Der synthetische Releasingfaktor führte zu einem Anwachsen des gesamten FSH- und LH-Gehalts in den Kulturen. Die Behandlung von Rattenhypophysen in vitro mit dem synthetischen Releasingfaktor stimuliert LH und FSH gleichermaßen (SCHALLY, REDDING, MATSUO und ARIMURA, 1972). Da kein Unterschied in den Wirkungen von OHE, dem synthetischen Releasingfaktor und Dibutyryl-cAMP besteht, kann man annehmen, daß der synthetische Releasingfaktor und der Schafshypothalamusextrakt OHE die Gonadotropine LH und FSH auf dem gleichen Weg über C-AMP freisetzen.

Die Rolle von c-AMP als möglicher Vermittler der Releasingfaktorwirkung wurde u.a. von JUTISZ und LLOSA (1969) untersucht. Diese Autoren stellten drei Bedingungen auf, die c-AMP erfüllen muß, wenn es eine Vermittlerrolle bei der biologischen Wirkung eines Hormons spielen soll:

- Unter der Releasingfaktorwirkung muß sich der c-AMP-Gehalt des Rezeptorgewebes erhöhen.
- Durch c-AMP muß die biologische Wirkung dieses Hormons nachgeahmt werden.
- Die Wirkung von c-AMP muß bei Anwesenheit von Phosphodiesterasehemmern größer werden.

JUTISZ und LLOSA beobachteten, daß c-AMP wie FRF aus inkubierten Rattenhypophysen FSH quantitativ freisetzen kann. Das Derivat

Dibutyryl-c-AMP zeigt den gleichen Effekt mit vierfach geringerer Dosis. Nach Zugabe des Phosphodiesterasehemmers Theophyllin war die Releasingfaktorwirkung auf die FSH-Freisetzung potensiert. GROOM, COOKE und BOYNS (1971) fanden in ihren Untersuchungen, daß c-AMP eine signifikant stärkere Wirkung auf die FSH- als auf die LH-Ausschüttung hat. Das Derivat Dibutyryl-c-AMP setzt FSH und LH in gleichem Umfang frei. Dibutyryl-c-AMP ist in vivo und in vitro wirksamer, wahrscheinlich aufgrund seiner Widerstandsfähigkeit gegenüber Phosphodiesterase und seinem leichteren Transport in die Zelle (ROBINSON et al. 1968).

ZOR, KANEKO, SCHNEIDER, McCANN und FIELD (1970) konnten nach Gabe von Schafshypothalamusextrakten eine vermehrte LH-Ausschüttung, eine Zunahme der c-AMP-Konzentration und der Adenylcyclaseaktivität in Rattenadenohypophysenkulturen feststellen. Hypothalamische Extrakte zeigten keine Wirkung auf die Phosphodiesterase und die ATP-ase. Bei Gabe des Phosphodiesterasehemmstoffs Theophyllin kam es zur Erhöhung der c-AMP-Konzentration im Hypophysenvorderlappen und zur Potensierung der Hypothalamusextraktwirkung auf c-AMP. Der LH-Release wurde bei diesen Versuchen jedoch nicht beeinflußt. Die gleichen Beobachtungen machten TANG und SPIES (1974) bei Gabe von synthetischem Releasingfaktor, bzw. Theophyllin und c-AMP in Monolayeradenohypophysenkulturen von Affen (Macaca fascicularis).

Die Bildung von c-AMP aufgrund von Hypothalamusextrakten wird durch die Abwesenheit von Calcium nicht beeinflußt. Das Fehlen einer Wirkung von Hypothalamusextrakt sowohl auf die Phosphodiesterase als auch auf die ATP-ase veranlaßt ZOR, KANEKO, SCHNEIDER, McCANN und FIELD eine direkte Wirkung auf die Adenylcyclaseaktivität zu postulieren.

3. Rezeptoren

Nach Implantation von Östrogenen in den Hypothalamus ist der LH-Gehalt (KANEMATSU und SAWYER, 1964) und der FSH-Gehalt (MARTINI et al. 1968) des Hypophysenvorderlappen vermindert. CHOWERS und McCANN (1965) nehmen an, daß infolge des LH-RF-Mangels an der Hypophyse nach intrahypothalamischer Implantation keine Gonadotropinsynthese erfolgt. Werden die Östrogene dagegen in die Hypophyse implantiert, kann man eine geringe Freisetzung von LH feststellen. GROOM und BOYNS (1973) konnten nach einmaliger Gabe von 17-ß-Östradiol in menschliche foetale Adenohypophysenkulturen eine FSH- nicht aber eine LH-Freisetzung beobachten. Testosteron und Progesteron ließen bei diesen Versuchen eine Wirkung auf die Gonadotropinausschüttung vermissen.

Aufgrund zahlreicher Versuche postuliert man heute im Hypothalamus und in der Hypophyse östrogensensible Rezeptoren.

MICHAEL et al. (1962) sowie KATO und VILLEE (1967) wiesen durch Autoradiographie Östrogenanreicherungen in der Eminentia mediana nach.

Die Ovarialhormone vermögen den Hypophysenvorderlappen zu stimulieren und zu hemmen. Eine Stimulation, d.h. ein positiver feed-back, liegt dem sog. Hohlweg-Effekt zugrunde (HOHLWEG, H. und JUNKMANN, K., 1932): Eine einmalige Östrogeninjektion bewirkt eine Corpus-luteum-Bildung.

SAWYER et al. (1949), FLERKO et al. (1957), DÖCKE und DÖRNER (1965) bestätigten eine Gonadotropininkretion durch Östrogene bei Intaktheit des Hypophysen-Hypothalamus-Systems. Die Östrogene wirken dabei vorwiegend auf den Hypophysenvorderlappen und erhöhen seine Sensibilität für die Releasingfaktoren. Bei den eben erwähnten Versuchen war die Östrogenapplikation einmalig und kurzfristig. Bei langfristiger Östrogengabe wird die hypophysäre Gonadotropininkretion gehemmt (MAHNERT, 1928). Einen negativen feed-back durch

Östrogene beschrieben auch PASCHKIS und RAKAFF (1950), PAESI und VAN REES (1960), KINCL et al. (1961) und McCANN et al. (1962).

Auch bei Östron (DORFMANN und DORFMANN, 1963), Progesteron (McCANN und RAMIREZ, 1964) und Testosteron liegt eine negative Rückkoppelung vor. GROOM und BOYNS (1973) stellten fest, daß die chronische Verabreichung von Progesteron in Adenohypophysenkulturen die Stimulation der Gonadotropinfreisetzung durch Schafshypothalamusextrakte verhinderte. Die Langzeitverabreichung von 17-ß-Östradiol änderte die Sensibilität gegenüber Schafshypothalamusextrakten nicht.

Durch exogen zugeführte Releasingfaktoren kann bei ovariektomierten, mit Östrogen und Progesteron blockierten Ratten eine Gonadotropininkretion aus dem Hypophysenvorderlappen ausgelöst werden (RAMIREZ und McCANN, 1963 a). CORBIN (1966) und DAVID et al. (1966) implantierten LH in den Hypothalamus und stellten eine Hemmung der LH-Inkretion aus dem Hypophysenvorderlappen fest. Dagegen fand nach Implantation von LH in die Hypophyse oder in andere Hirnregionen keine LH-Freisetzung aus der Adenohypophyse statt. Ähnlich wie bei den Östrogenen vermutet man auch für LH Rezeptoren in der Eminentia mediana (CORBIN, 1966 und CORBIN und COHEN, 1966). Die LH-Inkretion wird durch FSH-Implantation in den basalen Hypothalamus nicht beeinträchtigt.

Die Kontrolle der LH-Ausschüttung durch hypothalamische Mechanismen erfolgt vermutlich auf zwei verschiedenen Wegen (BARRACLOUGH, 1966):

- Das rostrale Zentrum in der präoptischen Region des Hypothalamus ist für die zyklische LH- und FSH-Ausschüttung zuständig, welche durch Östrogen und/oder Progesteron ausgelöst wird.
- Die mehr caudale Region, im Nucleus arcuatus-Eminentia mediana-Gebiet, ist für die basale Gonadotropinausschüttung verantwortlich und die sog. negative Rückkoppelung der gonadalen Steroide wird wahrscheinlich hier vermittelt.

Diese Vorstellung wird durch zwei Experimente unterstützt: Erstens durch die Implantation gonadaler Steroide in verschiedene Gebiete des Hypothalamus und zweitens durch Einschnitte direkt hinter dem Chiasma opticum, welche zu dem gleichen Ergebnis wie suprachiasmatische Läsionen führen und das zyklische Zentrum außer Funktion setzen (HALASZ, B. 1969).

Die Regelung der Keimdrüsenfunktion wird durch mindestens drei Regelkreise gesteuert (BLOBEL und SCHLUMBERGER, 1967):

1. Ovar $\xrightarrow{\text{Steroid}}$ Hypothalamus $\xrightarrow{\text{RF}}$ HVL $\xrightarrow{\text{Gonadotropine}}$ Ovar

2. Ovar $\xrightarrow{\text{Steroid}}$ HVL $\xrightarrow{\text{Gonadotropine}}$ Ovar

3. HVL $\xrightarrow{\text{Gonadotropine}}$ Hypothalamus $\xrightarrow{\text{RF}}$ HVL

III Der weibliche Zyklus als Funktion der Wechselwirkungen im Regelkreis, Synopse der Zyklussteuerung (nach TAUBERT, 1975)

Gegen Ende der Lutealphase eines Zyklus beginnt eine neue Generation von Follikeln zu wachsen. Die damit begonnene Follikelphase des folgenden Zyklus endet mit der Ovulation. Das Follikelwachstum wird wahrscheinlich durch das tonische Sexualzentrum in Gang gebracht.

Der Untergang des Corpus luteum führt zu einer vermehrten Gonadotropinausschüttung. Der vermehrt gebildete Releasingfaktor stimuliert die Synthese und Freisetzung von FSH. Das Corpus luteum des vorangegangenen Zyklus hemmt durch Östradiol und Progesteron lokal das Follikelwachstum. Deshalb können sich nur im Ovar der anderen Seite Follikel entwickeln.

Die Östrogenproduktion steigt etwa sieben Tage nach der Menstruation steil an. Dadurch wird das Follikelwachstum unterdrückt bis alle Follikel atretisch sind mit Ausnahme des einen, der den größten Wachstumsvorsprung besitzt. Aufgrund des long-feed-back hemmt der hohe Östrogenspiegel die FSH-RF-Ausschüttung am Hypothalamus.

Man nimmt an, daß ab einer bestimmten Östradiolplasmakonzentration das zyklische Sexualzentrum in der präoptischen suprachiasmatischen Region aktiviert wird, welches wiederum den ovulatorischen Gipfel auslöst. Beim mittzyklischen LH-Peak findet in der auf LH ansprechenden Theca interna des sprungreifen Follikels eine Luteinisierung statt. Infolgedessen steigt die Progesteroninkretion, Östradiol und Progesteron erreichen ihren zweiten Gipfel mit dem Höhepunkt des Corpus luteum. Damit sinkt wieder die FSH-Ausschüttung.

IV Ausgangspunkt für den experimentellen Teil der Arbeit

Die Entdeckung tubero-infundibulärer dopaminerger Neurone mit Zellkörpern die im Nucleus arcuatus liegen, und Axonen welche an der Eminentia mediana enden und Kontakt mit dem Portalkreislauf aufweisen (FUXE und HÖKFELT, 1969) legen den Verdacht nahe, daß Dopamin an der Kontrolle der adenophysären Inkretion beteiligt ist. Dopamin vermag weder in vitro noch bei Perfusion durch ein isoliertes Portalgefäß eine Gonadotropinausschüttung aus der Hypophyse zu bewirken. SCHNEIDER und McCANN (1970) inkubierten Hypothalamusfragmente mit Dopamin und stellten ebenso wie KAMBERI, SCHNEIDER und McCANN (1970), die Dopamin in den dritten Ventrikel von Versuchstieren injizierten, eine deutlich gesteigerte FSH- und LH-Ausschüttung fest. Die höchste LH-Freisetzung beobachteten SCHNEIDER und McCANN (1970) bei weiblichen Tieren, die kurz vor der Ovulation standen oder mit hohen Dosen von gonadalen Steroiden behandelt worden waren. Bei den Versuchen von CRAMER und PORTER (1973)

zeigte sich, daß Dopamin die Gonadotropine in höherem Maße freisetzt als Norepinephrin oder gar Epinephrin es vermögen. Die intraventriculäre Gabe von Dopamin bewirkt eine Releasingfaktorfreisetzung, die eine Gonadotropinausschüttung zur Folge hat (SCHNEIDER und McCANN, 1970 und KAMBERI und MICAL, 1969).

Im Gegensatz zu seinem stimulierenden Effekt auf die Gonadotropinfreisetzung kann Dopamin in vitro den Prolaktin-Release deutlich hemmen. Es verhindert bei der in vitro inkubierten Hypophyse die Prolaktinfreisetzung (MAC LEOD, 1969); bei Perfusion eines hypophysären Portalgefäßes ließ es jedoch diese Wirkung vermissen (KAMBERI, MICAL und PORTER, 1971). Bei Injektion in den dritten Ventrikel kann Dopamin eine Prolaktin inhibierende Aktivität freisetzen (KAMBERI, MICAL und PORTER, 1970).

Studien mit Rezeptorenblockern und Substanzen, welche die Katecholaminsynthese modifizieren, haben die mögliche Rolle des Dopamin bei der Gonadotropinfreisetzung nur wenig unterstützt. Die Studien unterstützen eher eine mögliche Rolle von Norepinephrin. McCANN, OJEDA, FAWCETT und KRULICH (1974) haben die Effekte dieser Substanzen in verschiedenen Situationen ausgewertet. Beim normalen Tier folgt auf die Entfernung der Gonaden ein Anstieg der LH- und FSH-Ausschüttung aus der Hypophyse, weil die hemmenden Einflüsse der gonadalen Steroide wegfallen. Bei den Versuchen von OJEDA, KRULICH und McCANN (1973) konnten Substanzen, welche die Katecholaminsynthese blockieren, und α-Blocker den Gonadotropinanstieg nach Kastration verhindern. Obwohl nicht schlüssig, schien die Blockade mehr mit der Hemmung von Norepinephrin als mit der Synthese von Dopamin zusammenzuhängen, besonders im Falle von LH. Der Dopaminrezeptorenblocker Pimozide^{R} verminderte teilweise die Antwort von FSH auf die Kastration. Die Fähigkeit von Progesteron (KALRA, P.S. und KALRA, S.P., KRULICH, FAWCETT und McCANN, 1972) und Östrogen (KALRA P.S. und McCANN, 1973) mit der normalen präovulatorischen Freisetzung der Gonadotropine zu interferie-

ren wurde ausgewertet und schließlich wurden die Wirkungen dieser Substanzen auf einen durch hypothalamische Stimulation provozierten LH-Release untersucht (KALRA S.P. und McCANN, 1973). Diese Experimente wiesen auf eine mögliche Rolle von Norepinéphrin bei der Vermittlung der Antworten hin.

Diäthyldithiocarbamat oder U 14624 blockieren die Norepinephrinsynthese und den Progesteron induzierten FSH- und LH-Release. Diese Blockierung kann durch Dihydroxyphenylserin, welches den Block umgeht und die Norepinephrinsynthese wieder herstellt, rückgängig gemacht werden. Norepinephrinsynthesehemmer blockierten sowohl die Östrogen stimulierte wie auch die normale präovulatorische Gonadotropinausschüttung.

Im Falle der hypothalamischen Stimulation ergab die Blockierung der Norepinephrinsynthese einen Stillstand der LH-Ausschüttung welche durch präoptische Stimulation provoziert worden war, wohingegen der LH-Release, welcher durch Stimulation der Eminentia-mediana-Nucleus-arcuatus-Region provoziert war, nicht beeinträchtigt wurde. McCANN, OJEDA, FAWCETT und KRULICH (1974) vermuten, daß im ersteren Fall präsynaptisch stimuliert wurde, während im zweiten Fall die Axonenden der RF-Neuronen direkt stimuliert wurden. Möglicherweise liegt in der präoptischen Region eine noradrenerge Synapse und die vermehrte Impulsrate, die am Nachmittag des Proöstrus oder nach einer Steroidbehandlung über diese Synapse läuft, vermittelt vielleicht die darauffolgende Gonadotropinausschüttung. Entsprechend dieser Vorstellung erhöht sich die Umsatzrate von Norepinephrin im vorderen Hypothalamus am Nachmittag des Proöstrus (DONOSO und DE GUTIERREZ, 1970). Dopaminerge Synapsen im Nucleus-arcuatus-Eminentia-mediana-Gebiet lösen vielleicht die Gonadotropinreleasingfaktorfreisetzung aus. Diese Synapsen können in die Vermittlung des negativen feed-back der gonadalen Steroide eingeschaltet sein, da Östrogen die Dopamin induzierte Freisetzung von LRF in vivo und in vitro hemmen kann (SCHNEIDER und McCANN,

1970). Diese postulierten Wirkungen von Dopamin und Norepinephrin passen zu der anatomischen Lokalisation der Katecholamine (FUXE und HÖKFELT, 1969).

Schlußfolgerungen

- Die Katecholamine können den Release von Gonadotropinen stimulieren und den von Prolaktin hemmen. Wahrscheinlich wird die Antwort der Gonadotropine auf der hypothalamischen Ebene vermittelt, während die Antwort des Prolaktins möglicherweise sowohl auf der hypothalamischen als auch auf der hypophysären Ebene vermittelt wird.

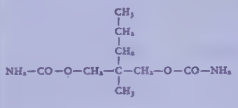
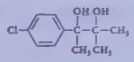
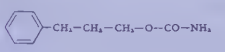
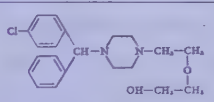
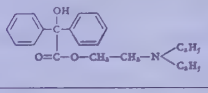
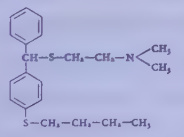
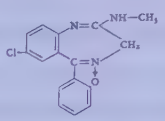
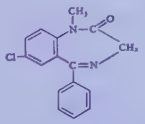
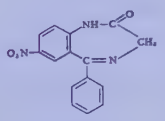
- Adrenerge Rezeptorenblocker können einerseits die Gonadotropinfreisetzung hemmen und andererseits die Prolaktinfreisetzung fördern. Alpha-Rezeptorenblocker verhindern die Gonadotropinfreisetzung während die Pimozide, ein Dopamin-Rezeptorenblocker, die Prolaktinfreisetzung steigert.

- Die Hemmung der Katecholaminsynthese führt zu einer Hemmung der Gonadotropinfreisetzung und einer verstärkten Prolaktinfreisetzung.

- Bei der Verwendung von Substanzen, welche die Norepinephrin- bzw. die Dopaminsynthese entweder hemmen oder steigern, scheint Dopamin eine wichtige Rolle als inhibitorischer Transmitter zur Senkung der Prolaktinkonzentrationen zu spielen, während Epinephrin wahrscheinlich bei der Stimulation der Gonadotropinfreisetzung mitwirkt.

- Eine erhöhte Impulsentladungsfrequenz dürfte über die noradrenergen Synapsen in der präoptischen Region des Hypothalamus bei der Vermittlung der präovulatorischen Gonadotropinfreisetzung eine Rolle spielen.

In dieser Arbeit wird die Wirkung von Diazepam auf die Freisetzung von Gonadotropinen aus der Hypophyse untersucht. Schon 1966 veröffentlichten SUPERSTINE und SULMAN eine Arbeit, in der sie u.a. die Wirkung von Diazepam auf die FSH- und LH-Ausschüttung prüften. Die Methode zur Feststellung des FSH- und LH-Release bestand damals in der Beobachtung vaginaler Parameter sowie in der histologischen Untersuchung der Keimdrüsen. In dieser Arbeit werden die FSH- und LH-Konzentrationen radioimmunologisch nach der Doppelantikörpermethode bestimmt.

Chemische Strukturformel	Chemische Kurzbezeichnung	Markenname	Durchschnittliche Tagesdosis	Indikationen	Begleiterscheinungen
2.1 Glykol-Derivate					
	Meprobamat	‹Aneural› ‹Biobamat› ‹Cyrpon› ‹Miltaun› ‹Miltown› ‹Pertranquil›	200–1200 mg	Angst- und Spannungszustände	Ataktische Störungen
	Phenaglycodol	‹Acalo› ‹Sinforil› ‹Ultran›	300–1500 mg	Angst- und Spannungszustände	Ataktische Störungen
2.2 Carbinole					
	Phenprobamat	‹Gamaquil›	400–1200 mg	Angst- und Spannungszustände	Ataktische Störungen
2.3 Diphenylmethan-Derivate					
	Hydroxyzin	‹Atarax›	30–75 mg	Angst- und Spannungszustände	Ataktische Störungen
	Benactyzin	‹Procalm› ‹Stoikon› ‹Suavitil›	3 6 mg	Angst- und Spannungszustände	Ataktische Störungen
	Captodiamin	‹Covatix›	150–450 mg	Angst- und Spannungszustände	Ataktische Störungen
2.4 Benzodiazepin-Derivate					
	Chlordiazepoxyd	‹Librium›	15–60 mg 100–300 mg	Angst- und Spannungszustände Alkoholpsychosen	Ataktische Störungen
	Diazepam	‹Valium› Roche	6–60 mg	Angst- und Spannungszustände, Insomnia	Ataktische Störungen
	Nitrazepam	‹Mogadan› Roche	5–20 mg (abends)	Insomnia	Ataktische Störungen

V Diazepam als Faktor für den Gonadotropinrelease

Diazepam, ein Psychopharmakon, gehört zu den Tranquillantien einer herterogenen Gruppe, die sich aus Carbinolen, Diphenylmethan-, Glykol- und Benzodiazepinderivaten zusammensetzt. Eine gemeinsame chemische Konstitution und pharmakologische Wirkung liegt nicht vor (siehe Tabelle S. 19, PÖLDINGER, 1967).

Die Benzodiazepine, deren Wirkungsweise auf zellulärer Ebene unbekannt ist, verursachen keine Stoffwechseländerungen die mit ihrem Effekt direkt in Verbindung stehen. Unter Benzodiazepinanwendung kommt es jedoch zur Änderung der elektrischen Aktivität in verschiedenen Teilen des Gehirns. Diazepam wirkt primär auf das limbische System, welches für das Affektverhalten (KLÜVER und BUCY, 1939; MAC LEAN, 1952) und die vegetativen Organfunktionen verantwortlich ist. Die elektrische Aktivität der Areale des limbischen Systems wird schon in Dosen herabgesetzt, die diejenige der Cortex cerebri noch unbeeinflußt lassen. Benzodiazepine erhöhen die Krampfschwelle gegenüber elektrischer Reizung im Nucleus amygdaleus und üben ganz allgemein einen hemmenden Einfluß auf das bahnende System der retikulären Formation (COPER, 1975).

Unter Diazepamverabreichung kommt es sowohl zu einem psychorelaxierenden als auch zu einem anxiolytischen Effekt. Gleichzeitig werden die poly-, kaum aber die monosynaptischen Reflexe gehemmt, was eine signifikante und dosisabhängige Relaxation der quergestreiften Muskulatur bewirkt. Da die Hirnrinde nur wenig beeinflußt wird, ist auch das Sensorium nur wenig beeinträchtigt.

In der Frauenheilkunde wird Diazepam vor allem zur Erleichterung der Geburt, im Sinne einer Anxiolyse, und dort eingesetzt, wo psychogen verursachte Spannungserhöhungen im sympathischen Nervensystem auftreten, z.B. beim prämenstruellen Syndrom oder beim Tubenspasmus. Die geburtserleichternde Wirkung von Diazepam ist

primär zentralen Ursprungs, da der autonome Tonus in parasympathischer Richtung verschoben wird, die Wehenfrequenz und -amplitude aber keine Veränderung erfahren (BAUMGARTEN, 1967).

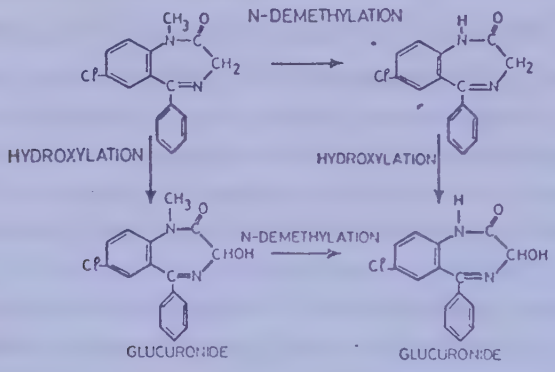
Diazepam (7 - Chlor -1,3- dihydro -1- methyl -5- phenyl -2H -1,4- benzodiazepin-2- on) ist eine schwache, schlecht wasserlösliche Base, die im Magen als dissoziiertes und wenig lipidlösliches Salz vorhanden ist und erst im leicht basischen Milieu des Dünndarms in Form der nicht dissoziierten, lipidlöslichen Base resorbiert wird.

Wird Diazepam intravenös injiziert, kommt es innerhalb der Kreislaufzeit (ungefähr zwanzig Sekunden) zu einer maximalen Konzentration des Wirkstoffes im Zentralnervensystem. Diazepam und seine Metaboliten können die Blut-Hirnschranke passieren und diffundieren leicht in die lipidhaltigen Nervenzellen. MARCUCCI, MUSSINI, GUAITANI, FANELLI und GARATTINI (1971) stellten fest, daß nach intravenöser Verabreichung die Benzodiazepinkonzentrationen im Gehirn der Maus, der Ratte und des Meerschweinchens größer waren als die in deren Blut. Mit Hilfe der Autoradiographie konnte man die Affinität von Diazepam zu bestimmten Gehirnteilen untersuchen (IDÄNPÄÄN-HEIKKILÄ, TASKA, ALLEN und SCHOOLER, 1971; MARSELLI, CASSANO, PLACIDI, MUSCETTOLA und RIZZO, 1973; VAN DER KLEIJN, 1969 + 1971).

VAN DER KLEIJN und WIJFELS (1971) beschrieben beim neugeborenen Rhesusaffen zehn Minuten nach intravenöser Injektion Diazepamanreicherungen in den grauen Strukturen der Cortex, des Cerebellum, des Hirnstammes und des Rückenmarkes sowie der peripheren Nerven. Einige Zeit später war das Pharmakon in der weißen Substanz der Rückenmarksstränge, in den peripheren Nerven, im Kleinhirn und in einigen Kernen des Hirnstammes retiniert. Die sofortige Anreicherung von Diazepam in der grauen Substanz wird mit der starken Durchblutung der betroffenen Strukturen in Zusammenhang gebracht.

Diazepam ist zu 96 % an Plasmaproteine gebunden. Nur der ungebundene Anteil vermag das Blutgefäßsystem zu verlassen und in die lipidhaltigen Gewebe einzudringen.

Die Elemination von Diazepam geschieht durch Biotransformation und Ausscheidung der Metaboliten, meist in konjugierter Form als Glukuronide.



Bei der Metabolisierung unterscheidet man zwischen einer schnellen Phase in Form einer N-Demethylierung (JOMMI, MANITTO und SILANOS, 1964; DE SILVA, SCHWARTZ, STEFANOVIC, KAPLAN und D ARCONTE, 1964) und einer langsamen Hydroxylierung am C_3-Atom, der geschwindigkeitslimitierenden Phase der Umwandlung. Die drei Metaboliten N-Demethyldiazepam, N-Methyloxazepam und Oxazepam teilen die meisten pharmakologischen Wirkungen der Muttersubstanz (GARATTINI et al., 1973 a, MARCUCCI, FANELLI, MUSSINI und GARATTINI, 1970; MARCUCCI, GUAITANI, FANELLI, MUSSINI und GARATTINI, 1971). Oxazepam weist jedoch nur ein Drittel bis ein Fünftel der Wirksamkeit von Diazepam auf (RANDALL, SCHECKEL und BANZIGER, 1965; STEIDINGER und SCHMID, 1970).

Im Mäusegehirn fand man nach Diazepamgabe eine Akkumulation von N-Demethyldiazepam und Oxazepam, im Meerschweinchengehirn nur N-Demethyldiazepam und im Rattenhirn praktisch keine Metaboliten.

Experimente mit Tritium markiertem Diazepam haben gezeigt, daß durchschnittlich 71 % der ursprünglich verabreichten Radioaktivität im Harn wieder vorliegt, wobei ein Drittel dieser Aktivität auf Oxazepam fällt (SCHWARTZ, KOECHLIN, POSTMA, PALMER und KROL, 1965). SCHWARTZ, KOECHLIN und KROL (1963) konnten einen Teil der Radioaktivität auch im Stuhl feststellen.

Nach den Arbeiten von VAN DER KLEIJN (1969 + 1971) beträgt die Halbwertszeit für Diazepam im Mittel 28 Stunden und diejenige für Demethyldiazepam zwei bis drei Tage. Aufgrund von Untersuchungen von KAMM und KELM (1969) und PELZER und MAASS (1969) schätzt man die Halbwertszeit von Oxazepam auf 15 bis 18 Stunden.

B FRAGESTELLUNG DER ARBEIT

In dieser Untersuchung wird der Frage nachgegangen

- ob nach der intravenösen Verabreichung von Diazepam LH und FSH aus der Hypophyse freigesetzt werden,
- ob eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen verabreichter Diazepammenge und der LH- und FSH-Inkretion besteht und
- wie sich nach Applikation verschiedener Diazepamdosen in Abhängigkeit von der Zeit die LH- und FSH-Aktivitäten im Plasma und in der Hypophyse ändern.

C MATERIAL UND METHODEN

I Nachweis der Gonadotropin-Releasing-Aktivität nach einer Modifikation der Methode von RAMIREZ und McCANN, 1963

RAMIREZ und McCANN fanden, daß ein Test mit ovariektomierten, Östrogen- und Progesteron blockierten Tieren empfindlicher ist, als ein Test mit nur ovariektomierten und Östrogen blockierten oder gar mit nur ovariektomierten Tieren. Als Versuchstiere dienen 200 g schwere weibliche Wistar-Ratten.

Arbeitsgang:

- Überprüfung der Geschlechtsreife durch Zykluskontrolle mit Hilfe von Vaginalabstrichen. Tiere ohne Zyklus werden ausgeschlossen.
- Bilaterale Ovariektomie in Äthernarkose
- Nach fünf Wochen Blockade des Hypothalamus der ovariektomierten Tiere mit 50 µg Östradiolbenzoat und 25 mg Progesteron durch getrennte subkutane Injektion in die Schenkelbeugen.
- 3 Tage nach der Blockade Injektion der Testsubstanz zusammen mit 500 E Heparin pro Tier in die Schwanzvene in Äthernarkose. Das injizierte Volumen beträgt 1 ml pro Versuchstier. Die Kontrollgruppe erhält unter den gleichen Bedingungen 1 ml 0,9 % NaCl-Lösung, die 500 E Heparin enthält.
- Entbluten der Tiere in Äthernarkose durch Punktion der Vena jugularis und Entnahme der Hypophysen.
- Zentrifugieren des Blutes
- Entnahme von 2 mal 500 µl aus dem Plasma jedes einzelnen Tieres für den späteren Immunologischen FSH- und LH-Nachweis.
- Poolen des restlichen Plasmas
- Aufteilung des gepoolten Plasmas in zwei Fraktionen für den biologischen LH- und FSH-Test.

- Einfrieren des Plasmas und der Hypophysen auf -20°C bis zur weiteren Aufarbeitung.

Materialien

- Weibliche Wistar-Ratten des Inzuchtstammes WU mit einem Gewicht von 200 g. Die Tiere, die von der medizinischen Versuchstierfarm S. Ivanovas, Kisslegg/Allgäu geliefert wurden, erhielten eine Standarddiät (Altromin K 15, Firma Altrogge, Lage/Lippe) und Wasser ad libidum.
- Östradiolbenzoat: Progynon B oleosum der Firma Schering AG, Berlin
- Progesteron : Progesteron Eifelfango der Firma Eifelfangos, Bad Neuenahr
- Heparin : Liquemin der Firma Hoffmann-La-Roche, Basel
- Diazepam : Valium der Firma Hoffmann-La-Roche, Basel
- NaCl 0,9 %

II FSH-Nachweis nach STEELMAN, S.M. und POHLEY, F.M. (1953)

POHLEY (1953) stellte fest, daß relativ hohe HCG-Dosen intakte infantile weibliche Ratten gegen exogenes FSH sensibilisieren, nicht aber gegen LH. Zwischen applizierter FSH-Menge und Ovargewichtszunahme besteht innerhalb gewisser Grenzen eine lineare Beziehung. POHLEY fand, daß, wenn man 10 - 50 I.U.HCG pro Tier spritzt, schon 0,1 - 0,2 mg FSH genügen, um einen gegenüber der HCG-Kontrolle signifikanten Anstieg des Ovargewichts zu erreichen. Die gleiche Menge FSH ohne HCG bewirkt keine Ovargewichtszunahme. POHLEY verwendete keine hypophysektomierten Tiere mehr, da er

feststellte, daß diese Tiere keine lineare Antwort auf die angewendeten FSH-Dosen gaben.

Prinzip

Sensibilisierung intakter infantiler weiblicher Ratten durch relativ hohe Dosen HCG für die Wirkung von FSH aufgrund einer linearen Beziehung zwischen der verabreichten FSH-Dosis und den Ovargewichten innerhalb gewisser Grenzen.

Arbeitsgang

- Zusammenfassung von 21 bis 22 Tage alten, zirka 40 g schweren infantilen weiblichen Wistarratten zu Gruppen von je 5 Tieren.
- Bei jeder Versuchsreihe laufen Gruppen mit, die 0,075 E und 0,0375 E S_2-FSH-Standard sowie Serum der Kontrolltiere enthalten.
- An 3 aufeinanderfolgenden Tagen werden im Abstand von 24 Stunden jedem Tier der entsprechenden Gruppe jeweils 13,3 I.U. HCG zusammen mit dem Testserum gespritzt. Das Volumen beträgt pro Tier und Applikation 1,5 ml (0,5 ml HCG-Lösung + 1,0 ml Testserum).
- 24 Stunden nach der letzten Injektion werden die Tiere mit Dichlormethan getötet und
  a) das Körpergewicht und das Gewicht der von Fett- und Bindegewebe befreiten Ovarien bestimmt und
  b) das Ovargewicht pro 100 g Tiergewicht errechnet.

Die Zunahme des Ovargewichts pro 100 g Körpergewicht im Vergleich zur Kontrollgruppe dient als Maß für die FSH-Aktivität.

Materialien

- Weibliche infantile Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von 40 - 45 g. Die Tiere wurden von der medizinischen Versuchstierfarm S. Ivanovas, Kisslegg/Allgäu geliefert und bekamen als Futter ausschließlich Äpfel, Möhren und getrocknetes Brot und Wasser ad libidum.
- HCG : (Primogonyl^{R} der Firma Schering AG, Berlin)
- NaCl 0,9 % : (Merck, Reag. Nr. 6404)
- NIH-FSH-S_2 : (National Institute of Health)
- Dichlormethan : (Merck, Reag. Nr. 6049)

III LH-Nachweis nach PARLOW, A.F. (1958)

Prinzip

Als Maß für die LH-Aktivität einer Substanz dient die Ascorbinsäureabnahme in den Ovarien intakter infantiler Ratten. Die Tiere werden mit Stutenserum (vorwiegend FSH-Aktivität) und Choriongonadotropin (LH-Aktivität) vorbehandelt um stark luteinisierte Ovarien zu erhalten.

Arbeitsgang

- 25 - 27 Tage alten 45 g schweren Wistar-Ratten wurden 50 I.U. Stutenserumgonadotropin subcutan injiziert.
- 56 - 63 Stunden später werden jedem Tier 25 I.U. Choriongonadotropin subcutan verabreicht.
- Am 9. Tag nach der ersten Injektion erfolgte die quantitative Bestimmung der Ascorbinsäure in den Ovarien:
  a) unilaterale Ovariektomie
  b) anschließend Injektion des Testplasmas bzw. einer LH-Standardlösung in die Schwanzvene.

c) 4 Stunden später werden die Ratten mit Dichlormethan getötet, die verbliebenen Ovarien präpariert und der Ascorbinsäuregehalt bestimmt.

Als Kontrolle für die jeweilige Gruppe dienen die vor Testbeginn durch unilaterale Ovariektomie entnommenen Ovarien.

Materialien

- Stutenserumgonadotropin: Anteron der Firma Schering, Berlin
- Choriongonadotropin : Primogonyl der Firma Schering, Berlin
- NIH-LH-S_5 : National Institute of Health, Endocrinology
- Dichlormethan : (Merck, Darmstadt) Reag.Nr. 6049

Ascorbinsäurebestimmung

Prinzip

- Oxydation der Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure mittels Dichlorphenolindophenol.
- Umsetzung von Dehydroascorbinsäure mit Dinitrophenylhydrazin zum Osazon.
- Lösung des Osazons in 85 % Schwefelsäure unter Entwicklung eines roten Farbstoffes.
- Photometrische Auswertung des Farbstoffes bei 520 nm (Zeiss Spektralphotometer PMG II)
- Bestimmung der Ascorbinsäuremenge die dem Extinktionswert entspricht, mit Hilfe einer Eichkurve.

Arbeitsgang

- Homogenisierung der Ovarien vor und nach Injektion der Testlösung in 10 ml frisch angesetzter kalter phosphoriger Säure.
- Filtration über Wathman Nr. 1 Filterpapier.
- Herstellung einer Mischung von:
  5 ml des klaren Filtrates mit
  10 ml 2 % Trichloressigsäure und
  3 ml 0,02 % Dichlorindophenollösung
- Ausschütteln des überschüssigen Farbstoffs mit 10 ml Amylacetat.
- Herstellung einer Mischung von
  4 ml der wässrigen Phase mit
  1 Tropfen 10 % Thioharnstofflösung und
  1 ml Dinitrophenylhydrazinlösung
- Erhitzen dieser Mischung in einem Wasserbad von 50°C 75 Minuten lang.
- Abkühlung im Eisbad und tropfenweise Zugabe von 5 ml 85 %iger Schwefelsäure.
- Nach 30 Minuten Messung der optischen Dichte bei 520 nm (Schichtdicke 10 mm) gegen einen Reagenzienleerwert.

Materialien

- Wathman Filterpapier Nr. 1 (vitaminfrei)
- 2 %ige Trichloressigsäure. 3 molare Trichloressigsäure 40 %ig (Merck AG, Reag. Nr. 811) wird mit Aqua dest. so verdünnt, daß eine 2 %ige Lösung entsteht.
- Thioharnstoff (Merck AG, Reag. Nr. 7979).
  10 g Thioharnstoff werden in einer 50 %igen Alkohollösung so gelöst, daß eine 10 %ige Thioharnstofflösung entsteht.

- Dichlorphenolindophenol-Natrium (Merck AG, Reag. Nr. 3028)
  Auflösung von 0,02 g in 100 ml Aqua dest.
- 2,4 Dinitrophenylhydrazin (Merck AG, Reag. Nr. 3081)
  Auflösung von 3 g in 44 %iger Schwefelsäure)
- Essigsäure-iso-amylester rein (Merck AG, Reag. Nr. 1231)
- Di-Phosphorpentoxyd (Merck AG, Reag. Nr. 570)
  Auflösung von 2,2 g in 97 ml Aqua dest.
- 95 - 97 %ige Schwefelsäure (Merck AG, Reag. Nr. 731)
  Verdünnung mit Aqua dest.

IV Aufarbeitung der Hypophysen nach einer Modifikation der Methode von PARLOW, A.F. (1964)

Prinzip

Mittels Aceton werden die Lipide aus den zerstoßenen Hypophysen herausgelöst. Das anschließend über Zwischenschritte gewonnene Hypophysentrockenpulver wird mit einem wässrigen Eiweißpuffer versetzt um das quantitativ zu bestimmende LH und FSH in Lösung zu bringen.

Arbeitsgang

- Auftauen der tiefgefrorenen Hypophysen
- Zugabe von 500 µl Aceton zu jeder einzelnen Hypophyse
- Zerstoßen der Hypophysen
- Schütteln auf Vortex
- Aufbewahrung bei + 4 ^{0}C für 48 Stunden
- Schütteln auf Vortex
- Abzentrifugieren

- Dekantieren des überstehenden Acetons
- Trocknen der Hypophysen bei Raumtemperatur
- Zugabe von 1 ml Puffer (1 % BSA, 0,01 M) zu jeder Hypophyse
- Schütteln auf Vortex
- Aufbewahrung bei + 4^{0}C für 48 Stunden
- Schütteln auf Vortex
- Abzentrifugieren
- Abziehen des Überstandes und Aufteilung in 2 Fraktionen für den immunologischen LH- und FSH-Test.

V Statistische Auswertung der Ergebnisse

1. Bestimmung der arithmetischen Mittelwerte
2. Berechnung der Standardabweichungen
3. Elimination von Werten, die außerhalb der zweifachen Standardabweichung liegen (= Ausschluß der Extrem- und Grenzwerte).
4. Varianzvergleich mit Hilfe des Fischer-Tests (F-Test)
5. Vergleich der Mittelwerte mit Hilfe des Student-Tests (t-Test) für unabhängige Stichproben

Signifikanzniveaus: F-Test : α = 0,05 = 5 % IW
t -Test : 2α = 0,01 = 0,5 % IW

VI Bestimmung der FSH- und LH-Konzentrationen mit Hilfe des Radio-Immuno-Assay (RIA)

1. Prinzip des Radio-Immuno-Assay

Die Serumkonzentration der Glykoproteine FSH und LH ist sehr niedrig. Sie liegt im Bereich von 10^{-9} g pro ml. Außerdem unterscheiden sie sich in ihrem chemischen Aufbau nicht wesentlich von anderen Eiweißstoffen, so daß es fast unmöglich ist, sie auf chemischen Wege zu identifizieren.

Die genannten Schwierigkeiten lassen sich umgehen, wenn man auf die Antigeneigenschaft der beiden Hormone zurückgreift. Radioaktiv markiertes Antigen (Hormon) reagiert ebenso mit dem spezifischen Antikörper wie unmarkiertes Antigen. Beide Antigene konkurrieren gleich heftig um die Bindungsstelle am Antikörper. Im Radio-Immuno-Assay wird diese Tatsache ausgenutzt.

Das mengenmäßig zu bestimmende unmarkierte Antigen (LH bzw. FSH) konkurriert mit einer konstanten Menge radioaktiv markierten Antigens (FSH bzw. LH) um den konstant im Unterschuß zugegebenen spezifischen Antikörper. Daher können nicht alle markierten und unmarkierten Antigene einen Platz am Antikörper finden; sie bleiben ungebunden.

Die Zeit, in der unmarkiertes und radioaktiv markiertes Antigen um die Bindung am Antikörper konkurrieren, ist die Inkubationszeit. Ihre Dauer hängt von der Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung ab. Wenn das Gleichgewicht einmal erreicht ist, bleibt der prozentuale Anteil der markierten und unmarkierten Antigene im Antigen-Antikörperkomplex unverändert gleich. Die Trennung der Antigen-Antikörperkomplexe von den freien Antigenen erfolgt in unserem Fall durch immunologische Fällung, d.h. ein weiterer Antikörper richtet sich gegen den Antigen-Antikörperkomplex.

Nach einer erneuten Inkubationszeit wird der ausgefällte Antigen-Antikörperkomplex abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die im Präzipitat gebundene Radioaktivität wird gemessen. Bei konstanter Konzentration der Antikörper und der markierten Antigene (Tracer) und bei gleichzeitiger Erhöhung der unmarkierten Antigenkonzentration nimmt die Radioaktivität im Antigen-Antikörperkomplex ständig ab.

Zu einer Eichkurve gelangt man, wenn man die gemessene Aktivität des Präzipitats auf der y-Achse gegen die Konzentration der unmarkierten Antigene (FSH- bzw. LH-Standard) auf der x-Achse aufträgt. Um eine unbekannte Antigen-Konzentration zu bestimmen, kann man entweder die Standardkurve benutzen und direkt ablesen oder ein Rechnersystem zwischenschalten.

Damit ein Rechner die Standardkurve abspeichern kann, wird in unserem Fall der Kurvenverlauf durch eine Transformation annähernd linear und damit dem Rechner zugängig gemacht. Bei der mathematischen Annäherungsgleichung handelt es sich um die log-logit-Transformation nach DAVID RODBARD.

2. Durchführung des Radio-Immuno-Assay

a) Hormonmarkierung

Chloramin T-Methode, GREENWOOD u. Mitarbeiter 1963

Bei einer noch nicht in allen Einzelheiten geklärten Reaktionsfolge wird im möglichst kleinvolumigen Markierungsansatz das Jodnuklid ($Na^{*}J$) durch Chloramin T zu kationischem Jod ($^{*}J^{+}$) oxydiert, welches an Tyrosylresten des zugegebenen Proteins H-Atome substituiert.

Nicht proteingebundenes $^{*}J^{+}$ wird schließlich mit Na-disulfid reduziert. Die Reaktion hat ein pH-Optimum von 7,5 und vollzieht sich bei $4^{0}C$ 3-4 mal langsamer als bei Zimmertemperatur. Es werden im Gegensatz zu anderen Markierungstechniken nur geringe Protein-

mengen (2 - 5 µg) und relativ niedrige Radioaktivitätsmengen (2 - 3 mCi) benötigt, um hohe spezifische Aktivitäten (z. B. bei Insulin bis zu 2700 mCi/µg) zu erhalten.

Nachteilig wirkt sich u.a. der direkte Kontakt eines Oxydationsmittels (Chloramin T) und hohen Konzentrationen von atomarem Jod mit dem Protein aus. So kann es zu Oxydation von Sulfhydrylgruppen bzw. oxydativer Sprengung von Disulfidbrücken zwischen Polypeptidketten oder Jodination von Histidin oder Tryptophanresten und damit zu irreversiblen Veränderung der Eiweißstruktur kommen, die sich im elektrophoretischen, sedimentativen, immunologischen und biologischen Verhalten manifestiert. Die Menge an Chloramin T und die Reaktionszeit wird deshalb auf ein Mindestmaß reduziert.

Arbeitsgang

α Herstellung einer Sephadex-Säule

- Bei einer serologischen 10 ml Glaspipette wird das Mundstück abgeschnitten und eine kleine Glasperle in die Pipettenspitze fallen lassen.
- Die Säule wird mit Sephadex G 75 bis zu einer Höhe von 10 cm gefüllt, nachdem man das Sephadex vorher bei Zimmertemperatur in Phosphatpuffer (0,01 M PO_4, 0,15 NaCl, pH 7,6) äquilibriert hat.
- Die Säule wird mit 1 ml Rinder-Serum-Albumin (2 % in Phosphatpuffer) überschichtet und dann mit Phosphatpuffer gewaschen.

ß Jodierung von NIAMDD-Rat LH-I-3 und NIAMDD-Rat FSH-I-3:
20 µl 0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,6 wird in die Jod-Ampulle (1 mCi J-125, Amersham Buchler IMS 30) gegeben.
Schütteln auf Vortex.

LH-I-3 bzw. FSH-I-3 (2 µg in 10 µl) wird zu dem Jod-Phosphatpuffer-Gemisch gegeben.
Schütteln auf Vortex.

20 µl Chloramin T (= 25 µg in 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,6) wird dem Gemisch zugegeben.
60 sek. ständig schütteln auf Vortex.

50 µl $Na_2S_2O_5$ (= 125 µg in 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,6) zugeben.
Schütteln auf Vortex.

Zugabe von 50µl Transfer-solution (10 ml Transfer-solution enthalten 100 mg KJ, 1 mg Bromphenolblau und 1,6 g Saccharose)
Schütteln auf Vortex.

Das Ampullengemisch wird mit einer Pasteurpipette auf eine Sephadex-G-75-Säule gebracht.

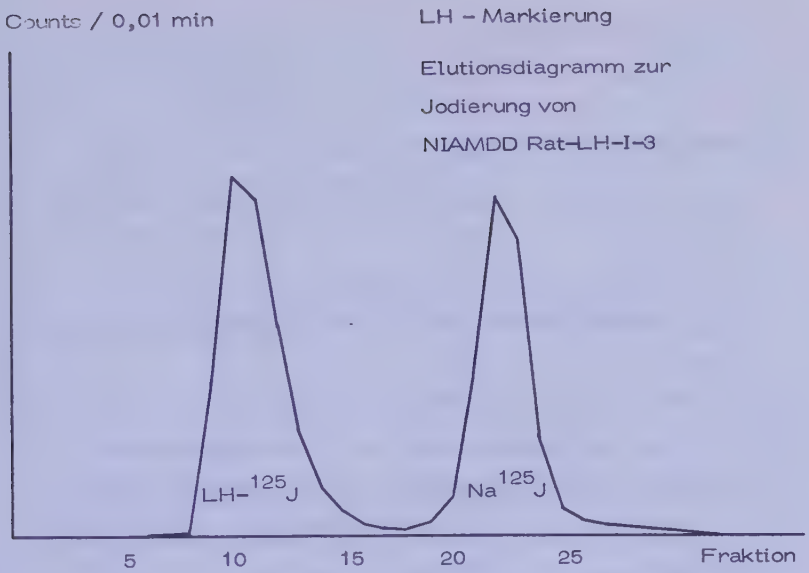
Die Jod-Ampulle wird mit 50 µl Rinse-Solution gespült, und diese Lösung ebenfalls auf die Säule gegeben (10 ml Rinse-Solution enthalten 100 mg KJ, 1 mg Bromphenolblau und 0,8 g Saccharose).

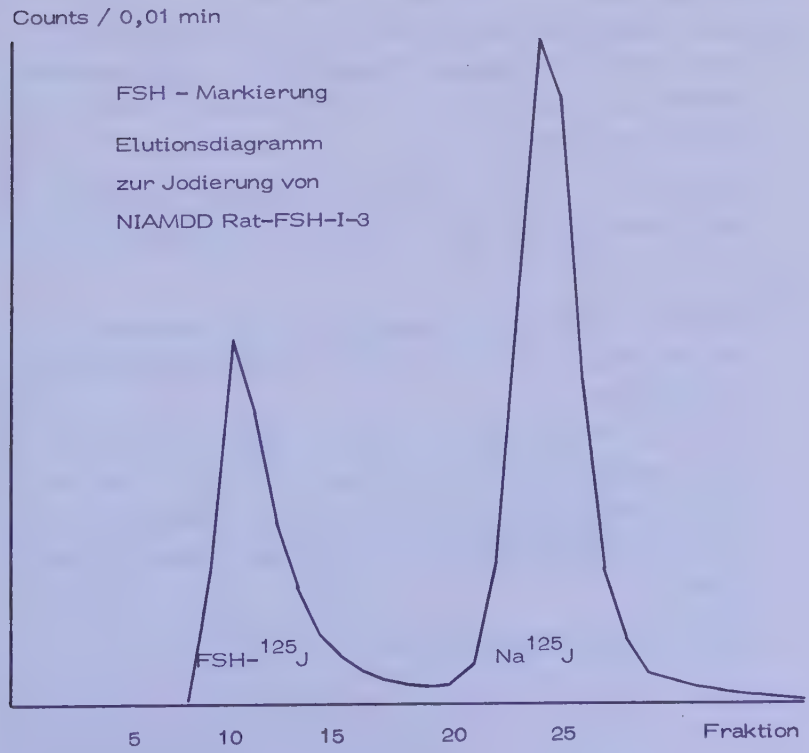
Je 0,5 ml Vorlage Phosphatpuffer in 35 Fraktionen.

Pro Röhrchen wird 0,5 ml Flüssigkeit aufgefangen.

Die einzelnen Fraktionen werden 0,01 min über dem Bohrloch des γ-Counters ausgezählt.

Zwei Gipfel der Radioaktivität werden festgestellt. Der erste Gipfel beginnt bei Fraktion 8 (8) und endet bei Fraktion 17 (18). Ein zweiter Gipfel, der u.a. freies ^{125}J enthält, beginnt bei Fraktion 19 (20). Das markierte Ratten-FSH findet sich im ersten Gipfel. Gewöhnlich enthält die Fraktion, die diesen Gipfel bildet, das am stärksten immunreaktive und am wenigsten beschädigte FSH. In unserem Fall trifft dies bei beiden Markierungen für Fraktion 10 zu. Die Fraktion 10 wird mit 0,1 % BSA/PBS-Puffer versetzt und so verdünnt, daß auf 100 µl 25000 cpm kommen.


Counts / 0,01 min
LH - Markierung
Elutionsdiagramm zur
Jodierung von
NIAMDD Rat-LH-I-3
LH-^{125}J
Na^{125}J
5
10
15
20
25
Fraktion


Counts / 0,01 min
FSH - Markierung
Elutionsdiagramm
zur Jodierung von
NIAMDD Rat-FSH-I-3
FSH-^{125}J
Na^{125}J
5
10
15
20
25
Fraktion

b) Erstellen einer Eichkurve

Um eine Eichkurve zu erstellen, werden 13 mal 3 Einwegröhrchen verwendet. Aus jedem Triplett wird nach Auszählung im γ -Counter das arithmetische Mittel gebildet.

- Die ersten Röhrchen (1a-c) dienen als "background" (BG) und bleiben leer.

- Die restlichen Teströhrchen (2a-13c) werden mit je 0,1 ml Tracer (NIAMDD-Rat LH-I-3 bzw. NIAMDD-Rat FSH-I-3) beschickt.
  Die Röhrchen 2a-c (TC) enthalten ausschließlich 0,1 ml Tracer. Sie werden im folgenden nur vom γ -Counter ausgezählt.

- In die Röhrchen 3a-c (NS) werden 0,7 ml, in 4a-c (BO) 0,5 ml und in die restlichen Röhrchen 0,4 ml Puffer (1 % BSA, 0,01 M) pipettiert.
  Der Standard fehlt in den Röhrchen 4a-c (BO). Der erste Antikörper ist vorhanden. Der Ausdruck BO/TC mal 100 sagt etwas darüber aus, wie groß die Bindung (in %) zwischen Tracer und spezifischem Antikörper ist.

- Zugabe von 0,1 ml Standardlösung (2,5 bis 1000 ng NIAMDD-Rat LH-RP-I bzw. NIAMDD-Rat FSH-RP-I) in die Röhrchen 5a bis 13c (B 1 - B 9).

- Zugabe von 0,2 ml Antikörperlösung I (NIAMDD-Anti-Rat LH-S-3 bzw. NIAMDD-Anti-Rat FSH-S-6) in die Röhrchen 4a bis 13c (BO - B9).
  Die Einwegröhrchen 3a-c liefern den NS-Wert; ihnen fehlt der erste Antikörper. Der Zahlenwert von NS/TC mal 100 gibt an wie groß die unspezifische Bindung mit dem 2. Antikörper (Anti-Kaninchen-Gammaglobulin) ist. Er soll maximal 5 % betragen.

- Durchschütteln der Teströhrchen.

- Erste Inkubation : t = 5 Tage
  T = + 4° C
- Zugabe von 0,2 ml Antikörperlösung II (Anti-Kaninchen-Gamma-globulin vom Esel, Titer 1:12)
- Zweite Inkubation: t = 2 Tage
  T = + 4° C
- Abzentrifugieren des Antigen-Antikörperkomplexes
  t = 120 min
  g = 2000
- Das Dekantieren muß innerhalb von 15 min nach dem Zentrifugieren erfolgen, da sich der Antigen-Antikörperkomplex sonst wieder vom Röhrchenboden löst.
- Messung der Radioaktivität des Präzipitats durch den γ-Counter. Die Zählzeit beträgt 3 min pro Röhrchen um eine ausreichende statistische Zählgenauigkeit zu erhalten.

Pipettierschema

Röhrchen-Nr. (a-c)		Puffer 1% BSA 0,01 M	Tracer FSH-I-3 bzw. LH-I-3	Standard FSH-RP-1 bzw. LH-RP-1 0,1 ml	1.Anti-K. FSH-S-6 bzw. LH-S-3	2.Anti-K. Anti-Kan. Gamma-globulin
BG	1	-	-	-	-	-
TC	2	-	0,1 ml	-	-	-
NS	3	0,7 ml	0,1 ml	-	-	0,2 ml
BO	4	0,5 ml	0,1 ml	-	0,2 ml	0,2 ml
B1	5	0,4 ml	0,1 ml	2,5 ng	0,2 ml	0,2 ml
B2	6	0,4 ml	0,1 ml	5,0 ng	0,2 ml	0,2 ml
B3	7	0,4 ml	0,1 ml	10,0 ng	0,2 ml	0,2 ml
B4	8	0,4 ml	0,1 ml	25,0 ng	0,2 ml	0,2 ml
B5	9	0,4 ml	0,1 ml	50,0 ng	0,2 ml	0,2 ml
B6	10	0,4 ml	0,1 ml	100,0 ng	0,2 ml	0,2 ml
B7	11	0,4 ml	0,1 ml	250,0 ng	0,2 ml	0,2 ml
B8	12	0,4 ml	0,1 ml	500,0 ng	0,2 ml	0,2 ml
B9	13	0,4 ml	0,1 ml	1000,0 ng	0,2 ml	0,2 ml

Graphische Darstellung der Eichkurve

- Halblogarithmisch:

  x - Achse : Dosis, aufgetragen im logarithmischen Maßstab

  y - Achse : B/BO mal 100

  siehe Abb. a - c

- nach der logit-log-Transformation:

  x - Achse : Dosis, aufgetragen im logarithmischen Maßstab

  y - Achse : Einteilung in Logits (L)

  $$L = \frac{\ln y}{1 - y} \; ; \qquad y = \frac{B}{BO}$$

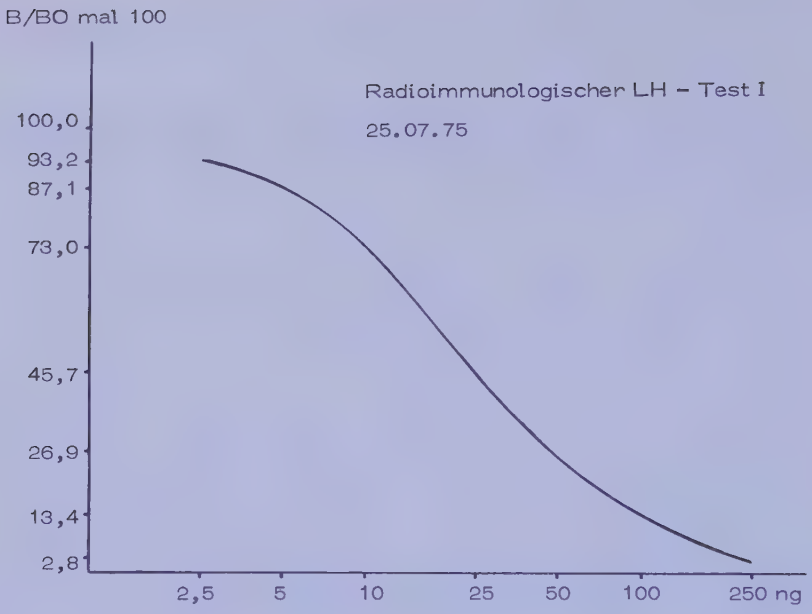
  siehe Abb. d u. e

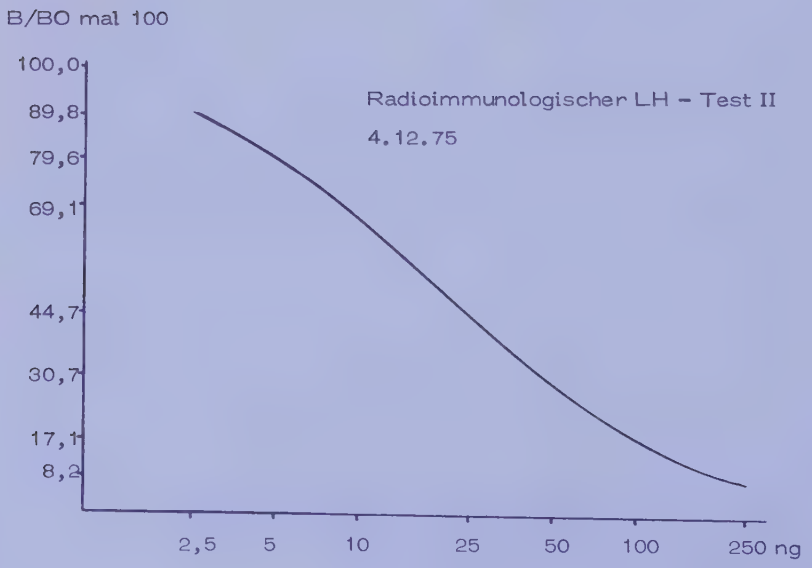
  Anmerkung

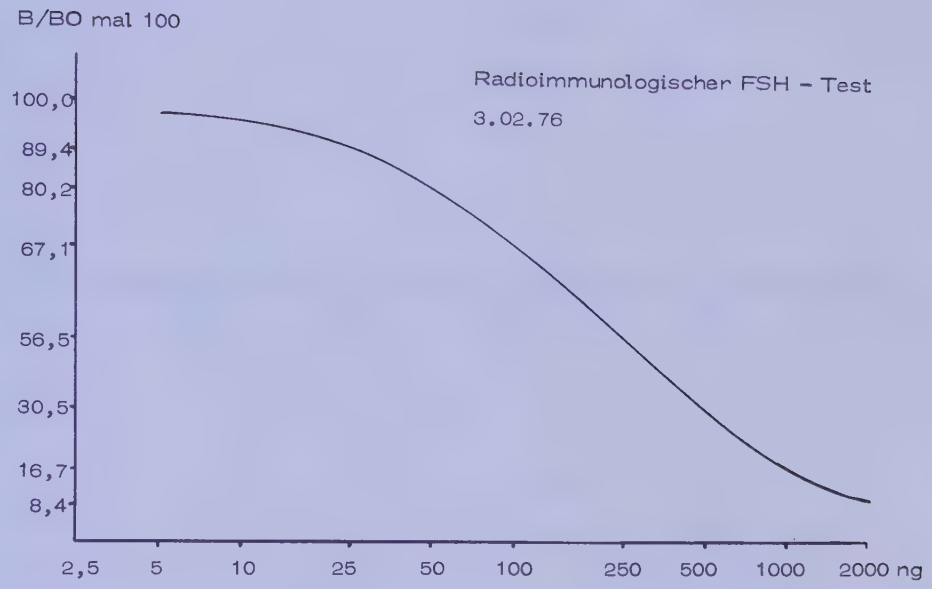
  B = mittlere Count-Zahl bei einem Standard

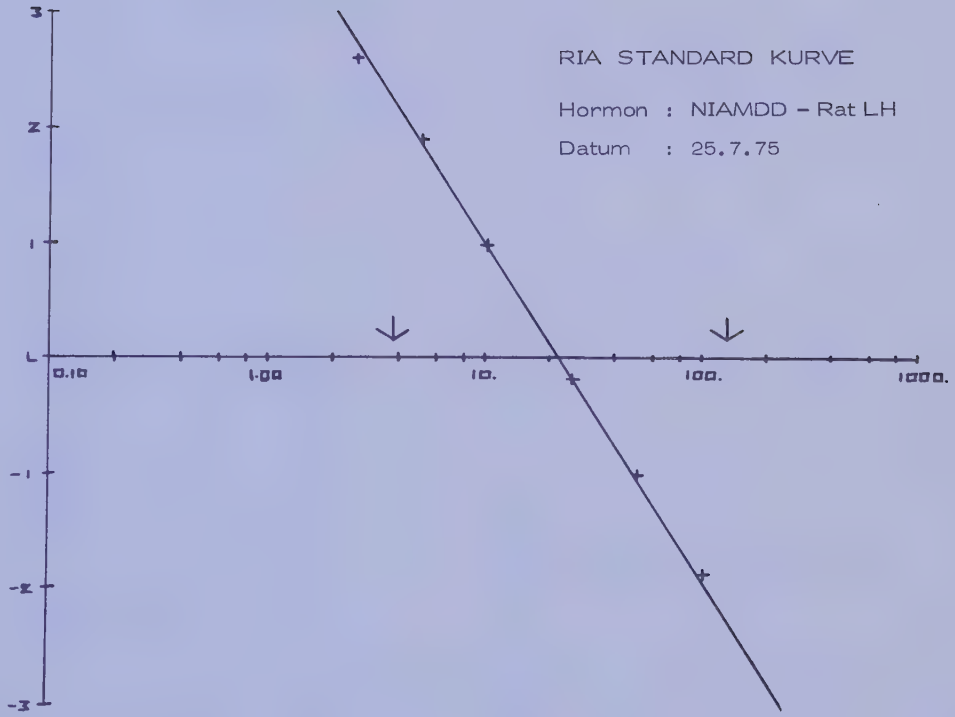
  BO mittlere Count-Zahl ohne Antigen

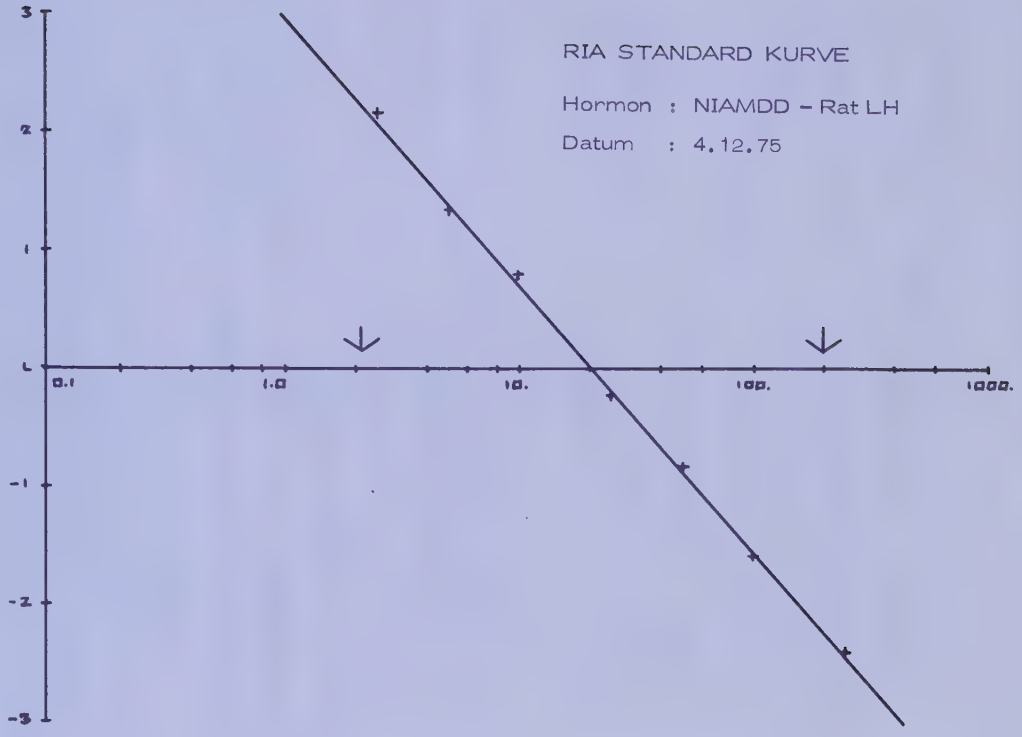
  Nachdem für jeden B-Wert der entsprechende Logit-Wert gemäß der oben genannten Formel errechnet und in das Koordinatensystem übertragen ist, legt der Rechner eine Gerade annähernd durch die Punkte. Die Gerade ist durch Steigung und Schnittpunkt mit der x-Achse charakterisiert. Die eingegebenen x-Werte (B_1 - B_9) differieren etwas von den kalkulierten x-Werten der Gerade. Der Quotient D/X gibt diesen Fehler in % an; D = CX - X.


B/BO mal 100
Radioimmunologischer LH - Test I
25.07.75
100,0
93,2
87,1
73,0
45,7
26,9
13,4
2,8
2,5
5
10
25
50
100
250 ng


B/BO mal 100
Radioimmunologischer LH - Test II
4.12.75
100,0
89,8
79,6
69,1
44,7
30,7
17,1
8,2
2,5
5
10
25
50
100
250 ng


B/BO mal 100
Radioimmunologischer FSH - Test
3.02.76
100,0
89,4
80,2
67,1
56,5
30,5
16,7
8,4
2,5
5
10
25
50
100
250
500
1000
2000 ng


RIA STANDARD KURVE
Hormon : NIAMDD – Rat LH
Datum : 25.7.75
3
2
1
0
-1
-2
-3
0.10
1.00
10.
100.
1000.


RIA STANDARD KURVE
Hormon : NIAMDD – Rat LH
Datum : 4.12.75
3
2
1
0
-1
-2
-3
0.1
1.0
10.
100.
1000.

c) Bestimmung des FSH- bzw. LH-Gehalts der Testseren

Zur Auswertung der Seren werden pro Hormon keine Dreifachproben verwendet. Das arithmetische Mittel wird nur aus Doppelproben gebildet.

Arbeitsgang:

- Einpipettieren von 0,4 ml Puffer (1 % BSA, 0,01 M)
- Einpipettieren von 0,1 ml Tracer
  (NIAMDD-Rat LH-I-3 bzw. NIAMDD-Rat FSH-I-3)
- Einpipettieren von 0,1 ml Serum.
  Die einzelnen Plasmaproben wurden zuvor aufgetaut und zwei Minuten lang zentrifugiert um sie zu defibrinieren.
- Zugabe von 0,2 ml Antikörperlösung I
  (NIAMDD-Anti-Rat LH-S-3 bzw. NIAMDD-Anti-Rat FSH-S-6)
- Durchschütteln der Teströhrchen
- Erste Inkubation : t = 5 Tage
  T = + 4°C
- Zugabe von 0,2 ml Antikörperlösung II
  (Anti-Kaninchen-Gammaglobulin vom Esel)
- Zweite Inkubation : t = 2 Tage
  T = + 4° C
- Abzentrifugieren: t = 120 min
  g = 2000
- Dekantieren
- Messung der Radioaktivität, Zählдauer: 3 min.

d) Bestimmung des FSH- bzw. LH-Gehalts der Hypophysen

Die tiefgefrorenen Hypophysenlösungen werden aufgetaut, zentrifugiert und mit einem 1 % Eiweißpuffer (1 % BSA, 0,01 M) 1:100 verdünnt. Der Arbeitsgang ist der gleiche wie bei der Bestimmung des FSH- bzw. LH-Gehalts der Testseren mit der Ausnahme, daß statt

dem Serum Hypophysenlösung verwendet wird. Aus der 1:100 Verdünnung wird für den LH-Test 10 µl und für den FSH-Test 100 µl Hypophysenlösung entnommen.

3. Materialien

EDTA Titriplex III	(Merck Reag. Nr. 8418)
Na_2HPO_4 2 H_2O	(Merck Reag. Nr. 6580)
KH_2PO_4	(Merck Reag. Nr. 4873)
NaCl	(Merck Reag. Nr. 6404)
NaN_3	(Merck Reag. Nr. 6688)
$Na_2S_2O_5$	(Merck Reag. Nr. 6528)
Chloramin T	(Merck Reag. Nr. 2426)
KJ	(Merck Reag. Nr. 5043)
Bromphenolblau	(Merck Reag. Nr. 8122)
Saccharose	(Merck Reag. Nr. 7653)
BSA	(Behring Werke Marburg)
NRS	(Wellcome Beckenham England)
Anti Rabbit Precipitating Serum (Donkey) = Doppelantikörper	(Wellcome Beckenham England)
Sephadex G-75	(Pharmacia Fine Chemical AB Uppsala Schweden)
^{125}J als NaJ IMS - 30	(Amersham Buchler, Frankfurt/Main)
Teströhrchen 10 x 75 mm	(Sarstedt Nümbrecht-Rommelsdorf, Best.-Nr. 7511)
* Gereinigtes Ratten-LH zur Radiojodierung	(NIAMDD-Rat LH I-3)

* Gereinigtes Ratten-FSH zur Radiojodierung (NIAMDD-Rat FSH I-3)

* Anti-Serum (NIAMDD Anti-Rat LH-S-3)
(NIAMDD Anti-Rat FSH-S-6)

* Diese Substanzen wurden freundlicherweise vom Nation Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Disease, National Institutes of Health, Rat Pituitary Hormone Distribution Program zur Verfügung gestellt.

D ERGEBNISSE

Testgruppe 1 : Dosisabhängigkeit der LH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen 60 Minuten nach intravenöser Injektion verschiedener Mengen Diazepam.

Testgruppe 2 : Dosisabhängigkeit der LH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen 150 Minuten nach intravenöser Injektion verschiedener Mengen Diazepam.

Testgruppe 3 : Zeitliche Abhängigkeit (Kinetik) der LH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen nach intravenöser Injektion von 0,25 mg (= 250 µg) Diazepam.

Testgruppe 4 : Zeitliche Abhängigkeit der LH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen nach intravenöser Injektion von 0,03125 mg (= 31,25 µg) Diazepam.

Testgruppe 5 : Dosisabhängigkeit der FSH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen 60 Minuten nach intravenöser Injektion verschiedener Mengen Diazepam.

Testgruppe 6 : Dosisabhängigkeit der FSH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen 150 Minuten nach intravenöser Injektion verschiedener Mengen Diazepam.

Testgruppe 7 : Zeitliche Abhängigkeit der FSH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen nach intravenöser Injektion von 0,25 mg (= 250 µg) Diazepam.

Testgruppe 8 : Zeitliche Abhängigkeit der FSH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen nach intravenöser Injektion von 0,03125 mg (= 31,25 µg) Diazepam.

Testgruppe 9 : Zeitliche Abhängigkeit der LH-Aktivität im Plasma nach intravenöser Injektion von 0,01 µg LH-RH.

Testgruppe 10 : Zeitliche Abhängigkeit der LH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen nach intravenöser Injektion von 0,01 µg LH-RH + 250 µg Diazepam.

Testgruppe 11 : Zeitliche Abhängigkeit der FSH-Aktivität im Plasma nach intravenöser Injektion von 0,01 µg LH-RH.

Testgruppe 12 : Zeitliche Abhängigkeit der FSH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen nach intravenöser Injektion von 0,01 µg LH-RH + 250 µg Diazepam.

Testgruppe 1, Dosiswirkungsbeziehung bei 60 Minuten:

a) immunologische Auswertung:

Tabelle 1 und 2 sowie die Abbildungen 1 und 2 zeigen die Dosisabhängigkeit der LH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen ovariektomierter Östrogen-Progesteron blockierter Wistar-Ratten nach Gabe von Diazepam (Valium^{R}). Die gefundenen Serumwerte liegen zum größten Teil unter der Kontrolle, die Hypophysenwerte dagegen über den Kontrollwerten.

Aus Abb. 1 geht hervor, daß die LH-Serumkonzentration bei der höchsten Dosis (500 µg) am stärksten von den Kontrollwerten abweicht. Eine Dosisabhängigkeit bei niedrigeren Dosen ist schwer zu erkennen. Wie aus Abb. 2 zu ersehen ist, steigt der LH-Gehalt der Hypophyse bis zu einem Gipfel bei 125 µg an und fällt dann wieder ab. Die Konzentrationen bei 500 µg Diazepam liegen im Bereich der Kontrolle.

In den Abb. 1 und 2 lassen sich die Werte bei 125 µg am besten vergleichen. Bei dieser Dosis findet der höchste LH-Hypophysengehalt seine Entsprechung in einer deutlich erniedrigten LH-Serumkonzentration.

b) biologische Auswertung:

Der biologische LH-Test (Tab. 3 und Abb. 3) zeigt eine Ascorbinsäureverarmung zwischen 6,7 und 15,5 %. Die Werte liegen mit einer Ausnahme (Dosis : 125 µg) dicht beisammen. Mit 15,5% ist bei 125 µg Diazepam die Verarmung am stärksten.

Tabelle 1:

LH-Immunoassay, Dosiswirkungsbeziehung bei 60 Minuten:

Seren

Dosis (10^{-6}g)	bei (min)	Anzahl der Tiere	X (10^{-9}g/ml)	s_x	Signifikanz gegen Kontrolle
500	60	4	46,6	27,3	+ IW < 0,5 %
250	60	11	102,7	18,6	+ IW < 0,5 %
125	60	12	81,3	32,6	+ IW < 0,5 %
62,5	60	11	115,4	31,4	- IW < 1,0 %
31,25	60	24	94,9	25,9	+ IW < 0,5 %
phys. NaCl	30	19	158,2	52,0	

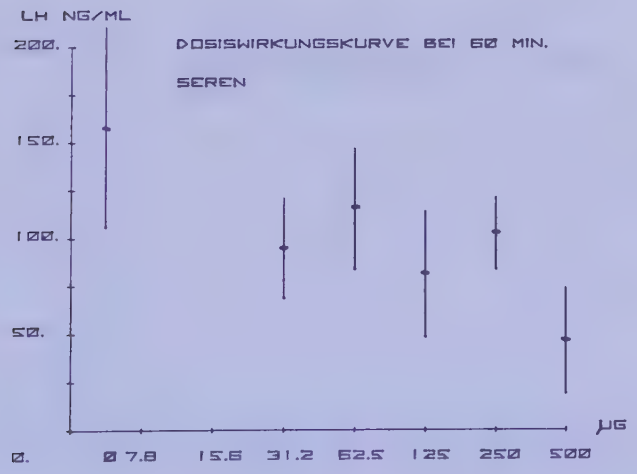


Abbildung 1:

Tabelle 2:

LH-Immunoassay, Dosiswirkungsbeziehung bei 60 Minuten:

Hypophysen

Dosis (10^{-6}g)	bei (min)	Anzahl der Tiere	$\bar{x}$ (10^{-6}g/Hy)	$s_{\bar{x}}$	Signifikanz gegen Kontrolle
500	60	11	1003,4	232,2	- IW < 2,5 %
250	60	11	1196,7	319,5	- IW > 25,0 %
125	60	11	1832,6	330,8	+ IW < 0,5 %
62,5	60	11	1811,5	262,4	+ IW < 0,5 %
31,25	60	23	1485,4	300,4	+ IW < 0,5 %
phys. NaCl	30	15	1184,5	183,0	

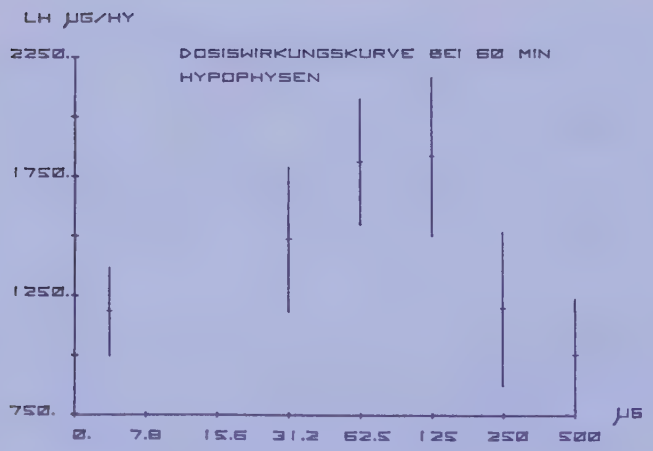


Abbildung 2:

Tabelle 3:

LH - Biologische Tests, Dosiswirkungsbeziehung bei 60 Minuten:

Seren

Dosis (10^{-6} g)	bei (min)	Anzahl der Tiere	% OAAD $\bar{x}$
500	60	8	9,5
250	60	8	10,5
125	60	4	15,5
62,5	60	4	11,0
31,25	60	8	6,7

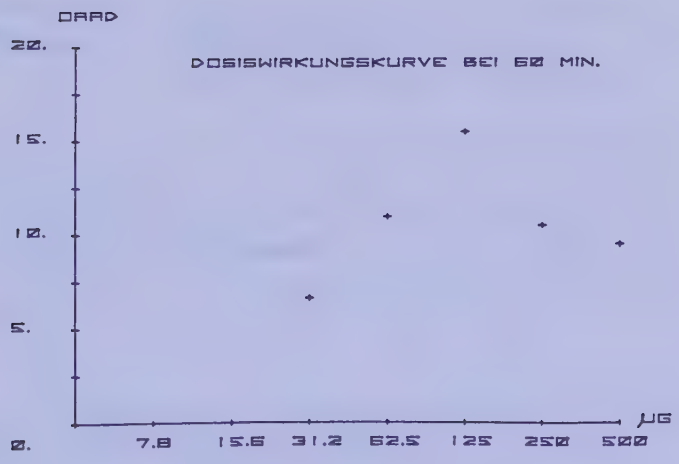


Abbildung 3:

Testgruppe 2, Dosiswirkungsbeziehung bei 150 Minuten:

a) immunologische Auswertung:

Tabelle 4 und 5 sowie die Abbildungen 4 und 5 zeigen die Dosisabhängigkeit der LH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen ovariektomierter Östrogen-Progesteron blockierter Wistar-Ratten nach Gabe von Diazepam (Valium^{R}).

Die mittleren Serumwerte liegen einheitlich unter der mittleren Serumkontrolle, die Hypophysenwerte dagegen zum größten Teil über der Kontrolle.

Abbildung 4 zeigt, daß die LH-Serumkonzentration bei 125 µg Diazepam am niedrigsten ist (86,6 ng/ml). Die Konzentrationen bei den restlichen Dosen weichen nur geringfügig voneinander ab.

Wie aus Abbildung 5 und Tabelle 5 zu ersehen, ist der mittlere LH-Gehalt der Hypophyse bei 125 µg Diazepam am größten. Die größte Schwankungsbreite findet sich jedoch bei 62,5 µg Diazepam (siehe Tab. 5).

Aus beiden Abbildungen ist gut zu erkennen, daß bei 125 µg Diazepam die geringste LH-Ausschüttung ins Plasma und die stärkste LH-Speicherung in der Hypophyse erfolgt.

b) biologische Auswertung:

Der biologische LH-Test (Tab. 6, Abb. 6) zeigt eine Ascorbinsäureverarmung zwischen 2,2 und 14,9 %. Die geringste Verarmung findet sich bei 62,5 µg Diazepam (2,2 %) gefolgt von den Dosen 125 µg (7,3 %) und 31,25 µg (7,5 %).

Tabelle 4:

LH-Immunoassay, Dosiswirkungsbeziehung bei 150 Minuten:

Seren

Dosis (10^{-6} g)	bei (min)	Anzahl der Tiere	$\bar{x}$ (10^{-9} g/ml)	$s_{\bar{x}}$	Signifikanz gegen Kontrolle
500	150	17	96,8	26,7	+ IW < 0,5 %
250	150	27	88,6	28,2	+ IW < 0,5 %
125	150	11	86,6	20,9	+ IW < 0,5 %
62,5	150	11	95,5	26,9	+ IW < 0,5 %
31,25	150	19	98,1	22,7	+ IW < 0,5 %
15,6	150	12	87,9	24,2	+ IW < 0,5 %
7,8	150	11	87,5	25,0	+ IW < 0,5 %
phys. NaCl	30	19	158,2	52,0	

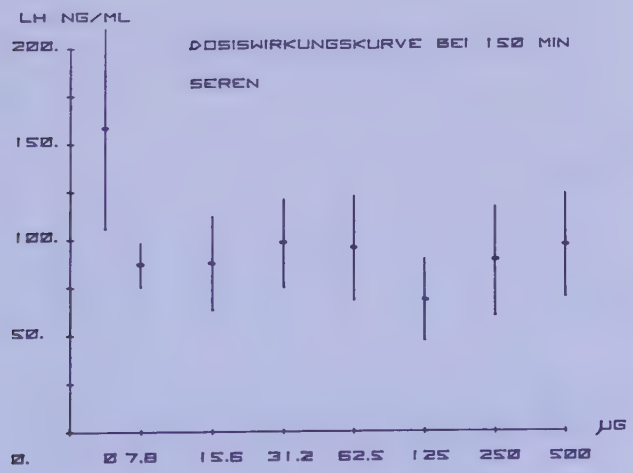


Abbildung 4:

Tabelle 5:

LH-Immunoassay, Dosiswirkungsbeziehung bei 150 Minuten:

Hypophysen

Dosis (10^{-6}g)	bei (min)	Anzahl der Tiere	X (10^{-6}g/Hy)	s_x	Signifikanz gegen Kontrolle
500	150	11	1389,8	281,6	- IW < 2,5 %
250	150	26	1329,9	456,4	- IW > 5,0 %
125	150	12	1555,2	323,0	+ IW < 0,5 %
62,5	150	11	1517,8	633,8	- IW < 1,0 %
31,25	150	21	1521,7	334,4	+ IW < 0,5 %
15,6	150	12	1204,1	199,2	- IW > 25,0 %
7,8	150	10	1534,9	344,6	+ IW < 0,5 %
phys. NaCl	30	15	1184,5	183,0	

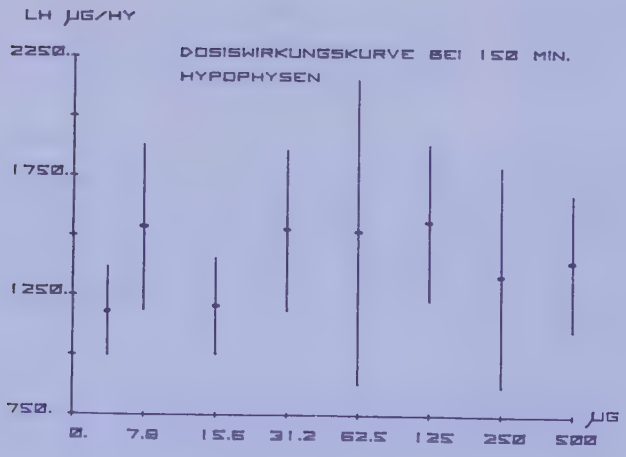


Abbildung 5:

Tabelle 6:

LH-Biologische Tests, Dosiswirkungsbeziehung bei 150 Minuten:

Seren

Dosis (10^{-6}g)	bei (min)	Anzahl der Tiere	% OAAD $\bar{x}$
500	150	12	13,6
250	150	16	14,9
125	150	4	7,3
62,5	150	4	2,2
31,25	150	8	7,5
15,6	150	4	11,2
7,8	150	4	0

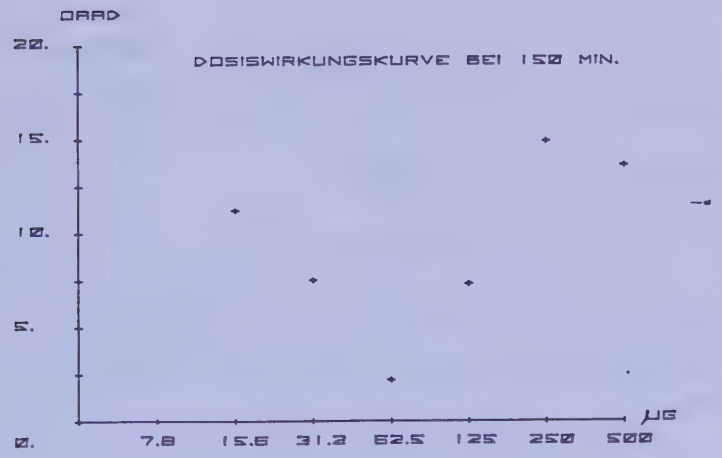


Abbildung 6:

Testgruppe 3, Kinetik bei 250 µg Diazepam:

a) immunologische Auswertung:

Tabelle 7 und 8, bzw. die Abbildungen 7 und 8 zeigen die zeitliche Abhängigkeit der LH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen nach intravenöser Injektion von 0,25 mg (= 250 µg) Diazepam.

Die mittleren LH-Serumwerte liegen mehrheitlich signifikant unter der mittleren Serumkontrolle. Die mittleren LH-Hypophysenwerte liegen bei den verschiedenen Zeiten größtenteils über der Kontrolle, wenn auch nicht signifikant.

Abbildung 7 zeigt, daß 150 und 390 Minuten nach intravenöser Injektion von 250 µg Diazepam die LH-Serumkonzentrationen am niedrigsten sind. Ein Gipfel in der LH-Serumkonzentration erkennt man jeweils 30 und 210 Minuten nach Injektion.

Der LH-Gehalt der entsprechenden Hypophysen ist 15, 120 und 390 Minuten nach i.v. Injektion von 250 µg Diazepam am höchsten und nach 210 Minuten am niedrigsten (Abb. 8).

Den niedrigen LH-Serumkonzentrationen bei 150 und 390 Minuten entsprechen hohe LH-Hypophysenwerte bei 120 und 390 Minuten. Bei 210 Minuten steht einer hohen Serumkonzentration ein niedriger hypophysärer LH-Gehalt gegenüber.

b) biologische Auswertung:

Der biologische LH-Test (Tab. 9 , Abb. 9) zeigt eine Ascorbinsäureverarmung zwischen 4,6 und 14,9 %. Eine geringe Verarmung findet sich bei 120 und 390 Minuten (4,6 bzw. 4,7 %), eine starke Ascorbinsäureabnahme dagegen bei 150 und 240 Minuten (jeweils 14,9 %).

Tabelle 7:

LH-Immunoassay, Kinetik bei 250 µg Diazepam:

Seren

Dosis (10^{-6} g)	bei (min)	Anzahl der Tiere	$\bar{x}$ (10^{-9} g/ml)	$s_{\bar{x}}$	Signifikanz gegen Kontrolle
250	15	11	108,3	39,1	- IW < 1,0 %
250	30	11	125,4	34,2	- IW < 5,0 %
250	60	11	102,7	18,6	+ IW < 0,5 %
250	90	11	119,9	24,1	- IW < 1,0 %
250	120	11	107,4	35,0	+ IW < 0,5 %
250	150	27	88,6	28,2	+ IW < 0,5 %
250	180	9	108,8	27,8	+ IW < 0,5 %
250	210	12	120,1	40,2	- IW < 2,5 %
250	240	10	107,2	25,5	+ IW < 0,5 %
250	270	11	108,1	17,7	+ IW < 0,5 %
250	300	11	119,1	25,4	- IW < 1,0 %
250	330	12	106,1	37,2	+ IW < 0,5 %
250	360	9	111,2	21,1	+ IW < 0,5 %
250	390	11	86,9	23,2	+ IW < 0,5 %
250	420	12	114,5	33,0	- IW < 0,5 %
phys. NaCl	30	19	158,2	52,0	

Tabelle 8:

LH-Immunoassay, Kinetik bei 250 µg Diazepam:

Hypophysen

Dosis (10^{-6}g)	bei (min)	Anzahl der Tiere	$\bar{x}$ (10^{-6}g/Hy)	$s_{\bar{x}}$	Signifikanz gegen Kontrolle
250	15	12	1380,5	359,0	- IW > 5,0 %
250	30	12	1243,1	264,0	- IW > 25,0 %
250	60	11	1196,7	319,5	- IW > 25,0 %
250	90	10	1357,1	274,7	- IW < 5,0 %
250	120	12	1371,6	301,1	- IW < 5,0 %
250	150	26	1329,9	456,4	- IW > 5,0 %
250	180	11	1211,5	255,6	- IW > 25,0 %
250	210	11	1111,0	159,7	- IW > 5,0 %
250	240	7	1115,1	175,4	- IW > 25,0 %
250	270	11	1211,8	414,0	- IW > 25,0 %
250	300	12	1348,5	342,4	- IW > 5,0 %
250	330	9	1290,9	227,5	- IW > 5,0 %
250	360	9	1430,5	263,5	- IW < 1,0 %
250	390	11	1532,9	247,7	+ IW < 0,5 %
250	420	11	1390,1	317,9	- IW < 5,0 %
phys. NaCl	30	15	1184,5	183,0	

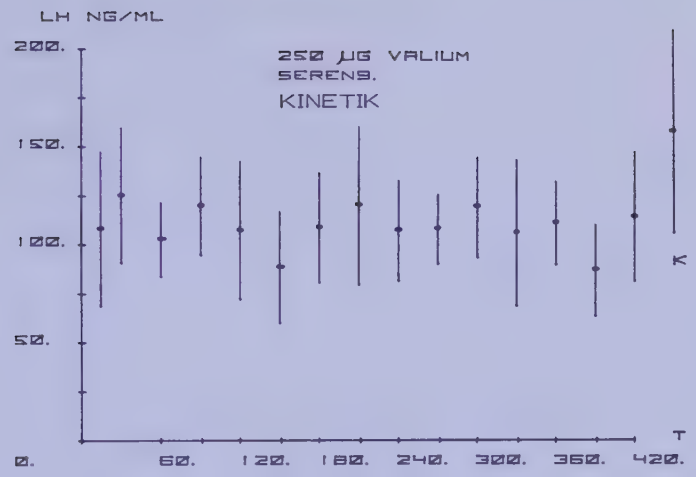


Abbildung 7:

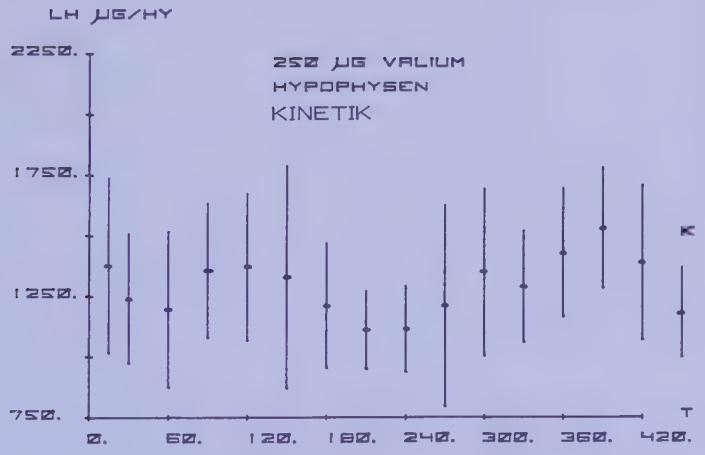


Abbildung 8:

Tabelle 9:

LH-Biologische Tests, Kinetik bei 250 µg Diazepam:

Seren

Dosis (10^{-6}g)	bei (min)	Anzahl der Tiere	% OAAD $\bar{x}$
250	15	4	0
250	30	8	0
250	60	8	10,5
250	90	4	0
250	120	12	4,6
250	150	16	14,9
250	180	8	7,1
250	210	4	0
250	240	8	14,9
250	270	4	0
250	300	4	6,4
250	330	4	7,6
250	360	4	5,5
250	390	4	4,7
250	420	4	9,4

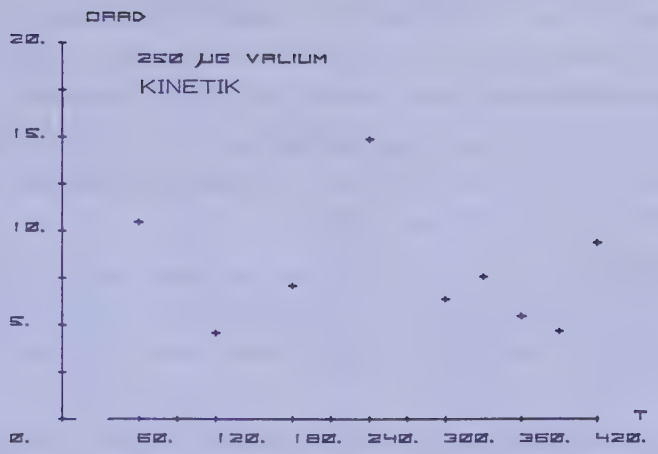

ORAD
20.
250 µG VALIUM
KINETIK
15.
10.
5.
0.
T
60.
120.
180.
240.
300.
360.
420.

Abbildung 9:

Testgruppe 4, Kinetik bei 31,25 µg Diazepam:

a) immunologische Auswertung:

Tabelle 10 und 11, bzw. die Abbildungen 10 und 11 zeigen die zeitliche Abhängigkeit der LH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen nach intravenöser Injektion von 31,25 µg Diazepam.

Die mittleren LH-Serumwerte liegen bis 180 Minuten nach Injektion signifikant unterhalb, ab 210 bis einschließlich 420 Minuten im Bereich der Serumkontrolle.

Aus Abbildung 11 ist zu ersehen, daß der hypophysäre LH-Gehalt bis 210 Minuten nach i.v.-Injektion über der Kontrolle liegt (teilweise sogar signifikant). Ab 240 Minuten liegen die Werte nur noch leicht über der Kontrolle.

Bis 180 Minuten nach i.v.-Injektion entsprechen den erniedrigten Serumkonzentrationen erhöhte Hypophysenwerte. Bei 210 Minuten liegt der LH-Hypophysengehalt noch deutlich über der Kontrolle, die LH-Serumkonzentration dagegen befindet sich schon im Kontrollbereich. Ab 240 Minuten bewegen sich sowohl Serum- als auch Hypophysenwerte im Bereich der Kontrollen.

b) biologische Auswertung:

Der biologische LH-Test (Tab. 12, Abb. 12) weist eine Ascorbinsäureverarmung zwischen 1,7 und 20 % auf. Im mittleren Bereich der Kinetik (von 60 bis 270 Minuten) kann man eine geringe Ascorbinsäureabnahme zwischen 5,6 und 9,8 % feststellen. Bei hohen und niedrigen Zeiten ist die prozentuale Verarmung größer.

Tabelle 10:

LH-Immunoassay, Kinetik bei 31,25 µg Diazepam:

Seren

Dosis (10^{-6}g)	bei (min)	Anzahl der Tiere	$\bar{x}$ (10^{-9}g/ml)	$s_{\bar{x}}$	Signifikanz gegen Kontrolle
31,25	15	12	95,5	22,8	+ IW < 0,5 %
31,25	30	11	95,9	14,3	+ IW < 0,5 %
31,25	60	24	94,9	25,9	+ IW < 0,5 %
31,25	90	11	121,1	27,9	- IW < 2,5 %
31,25	120	11	107,4	26,6	+ IW < 0,5 %
31,25	150	19	98,1	22,7	+ IW < 0,5 %
31,25	180	11	109,7	20,6	+ IW < 0,5 %
31,25	210	11	151,3	40,8	- IW > 25,0 %
31,25	240	12	172,4	60,6	- IW > 25,0 %
31,25	270	11	153,2	48,2	- IW > 25,0 %
31,25	300	12	167,3	53,2	- IW > 25,0 %
31,25	330	12	158,8	53,6	- IW > 25,0 %
31,25	360	12	141,7	39,8	- IW > 5,0 %
31,25	390	10	140,1	44,0	- IW > 5,0 %
31,25	420	12	139,3	29,2	- IW > 25,0 %
phys. NaCl	30	19	158,2	52,0	

Tabelle 11:

LH-Immunoassay, Kinetik bei 31,25 µg Diazepam:

Hypophysen

Dosis (10^{-6}g)	bei (min)	Anzahl der Tiere	$\bar{x}$ (10^{-6}g/Hy)	$s_{\bar{x}}$	Signifikanz gegen Kontrolle
31,25	15	11	1453,0	329,7	+ IW < 0,5 %
31,25	30	11	1529,0	367,5	- IW < 1,0 %
31,25	60	23	1485,4	300,4	+ IW < 0,5 %
31,25	90	12	1472,7	349,5	+ IW < 2,5 %
31,25	120	11	1358,2	290,6	- IW < 5,0 %
31,25	150	21	1521,7	334,4	+ IW < 0,5 %
31,25	180	12	1558,3	465,1	- IW < 2,5 %
31,25	210	12	1782,9	479,1	+ IW < 0,5 %
31,25	240	11	1204,0	249,7	- IW > 25,0 %
31,25	270	11	1325,5	305,3	- IW > 5,0 %
31,25	300	10	1371,3	272,4	- IW < 5,0 %
31,25	330	11	1325,9	160,7	- IW < 5,0 %
31,25	360	12	1165,6	441,0	- IW > 25,0 %
31,25	390	9	1294,0	189,4	- IW > 5,0 %
31,25	420	12	1780,6	289,4	+ IW < 0,5 %
phys. NaCl	30	15	1184,5	183,0	

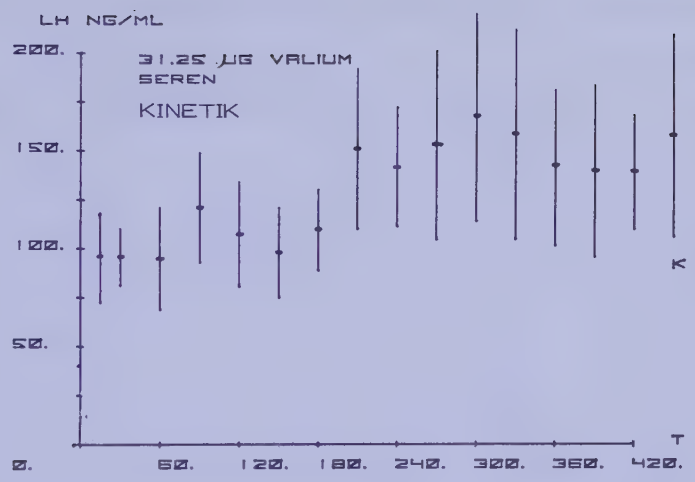


Abbildung 10:

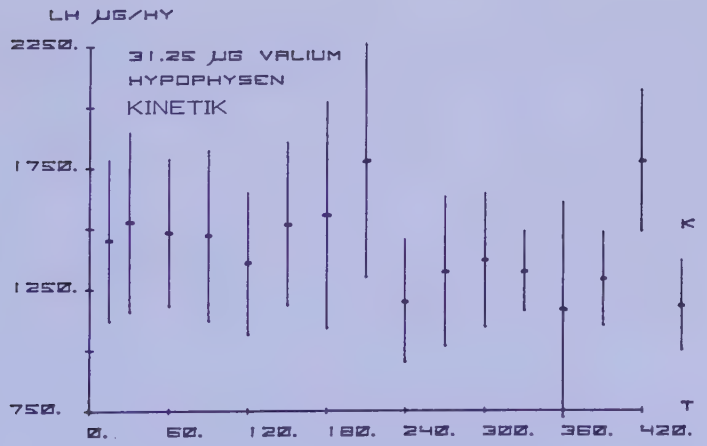


Abbildung 11:

Tabelle 12:

LH-Biologische Tests, Kinetik bei 31,25 µg Diazepam:

Seren

Dosis (10^{-6} g)	bei (min)	Anzahl der Tiere	% OAAD $\bar{x}$
31,25	15	4	16
31,25	30	4	39
31,25	60	8	6,7
31,25	90	4	0
31,25	120	4	7,3
31,25	150	8	7,5
31,25	180	4	5,6
31,25	210	4	0
31,25	240	4	9,8
31,25	270	4	6,5
31,25	300	4	1,7
31,25	330	4	0
31,25	360	4	18,6
31,25	390	4	0
31,25	420	4	10

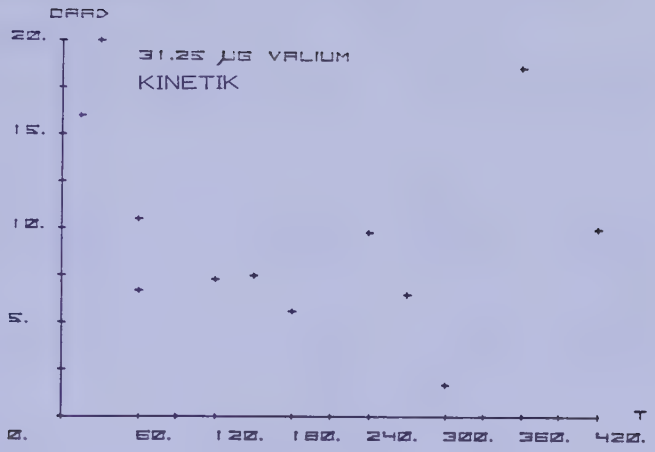


Abbildung 12:

Testgruppe 5, Dosiswirkungsbeziehung bei 60 Minuten:

a) immunologische Auswertung:

Tabelle 13 und 14, bzw. Abbildung 13 und 14 zeigen die Dosisabhängigkeit der FSH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen ovariektomierter Östrogen-Progesteron blockierter Wistar-Ratten nach Gabe von Diazepam (Valium^{R}).

Aus Abbildung 13 geht hervor, daß die mittleren FSH-Konzentrationen bei 125 und 500 µg Diazepam gegenüber der Serumkontrolle signifikant erniedrigt sind. Die Mittelwerte der übrigen Serumkonzentrationen weichen nicht wesentlich von der Kontrolle ab.

Wie aus Abbildung 14 zu ersehen, läßt der FSH-Gehalt der Hypophysen keine deutliche Dosisabhängigkeit erkennen. Die Werte bewegen sich alle im Kontrollbereich.

Den niedrigen FSH-Serumkonzentrationen bei 125 und 500 µg Diazepam 60 Minuten nach i.v.-Injektion steht kein über die Kontrolle erhöhter FSH-Hypophysengehalt gegenüber.

b) biologische Auswertung:

Im biologischen FSH-Test liegen die mittleren FSH-Serumkonzentrationen (Abb. 15) leicht über dem mittleren Kontrollwert mit Ausnahme der Konzentration bei 62,5 µg Diazepam, die gegenüber der Kontrolle etwas erniedrigt ist. Mit steigender Dosis nimmt zwischen 62,5 und 500 µg Diazepam auch die FSH-Serumkonzentration zu.

Tabelle 13:

FSH-Immunoassay, Dosiswirkungsbeziehung bei 60 Minuten:

Seren

Dosis (10^{-6} g)	bei (min)	Anzahl der Tiere	$\bar{x}$ (10^{-9} g/ml)	$s_{\bar{x}}$	Signifikanz gegen Kontrolle
500	60	14	1391,0	298,1	+ IW < 0,5 %
250	60	19	2435,3	616,5	- IW > 5,0 %
125	60	12	1801,3	348,9	+ IW < 0,5 %
62,5	60	11	2618,9	656,9	- IW > 5,0 %
31,25	60	22	2196,0	412,6	- IW > 5,0 %
phys. NaCl	30	20	2292,3	249,7	

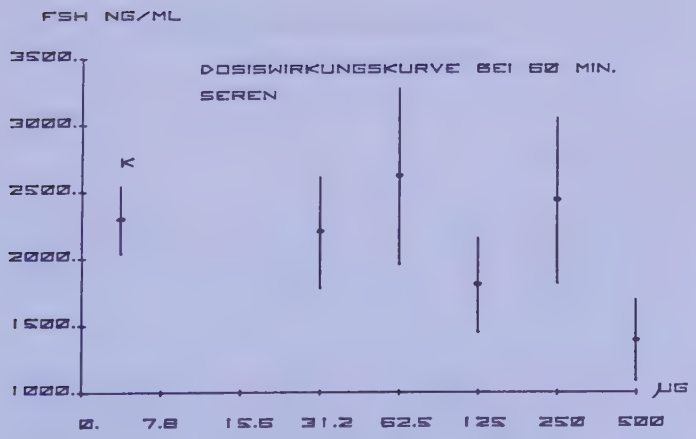


Abbildung 13:

Tabelle 14:

FSH-Immunoassay, Dosiswirkungsbeziehung bei 60 Minuten:

Hypophysen

Dosis (10^{-6}g)	bei (min)	Anzahl der Tiere	$\bar{x}$ (10^{-6}g/Hy)	s_x	Signifikanz gegen Kontrolle
500	60	19	305,6	142,6	- IW > 25,0 %
250	60	16	393,9	86,3	- IW < 5,0 %
125	60	10	289,5	44,6	- IW > 25,0 %
62,5	60	11	295,6	43,0	- IW > 25,0 %
31,25	60	22	284,0	81,7	- IW > 5,0 %
phys. NaCl	30	20	312,0	162,6	

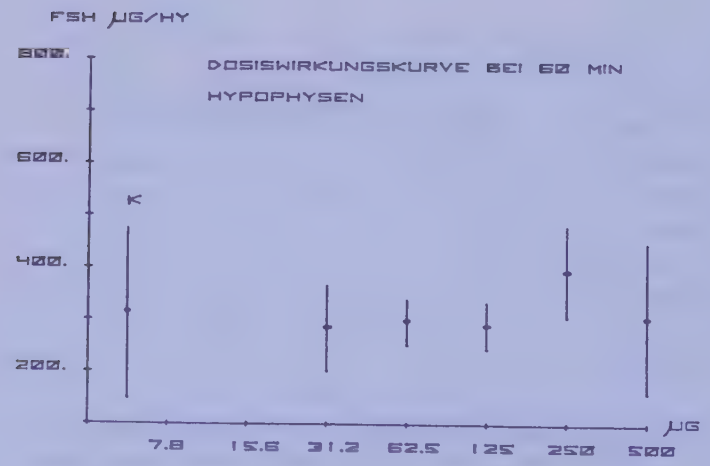


Abbildung 14:

Tabelle 15:

FSH-Biologische Tests, Dosiswirkungsbeziehung bei 60 Minuten:

Seren

Dosis (10^{-6}g)	bei (min)	Anzahl der Tiere	Ovargew. 100 g Tiergew. $\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	Signifikanz gegen Kontrolle
500	60	10	99,0	16,9	- IW > 2,5 %
250	60	9	91,3	14,4	- IW > 5,0 %
125	60	5	93,2	12,8	- IW > 5,0 %
62,5	60	5	80,4	12,6	- IW > 5,0 %
31,25	60	5	105,8	28,3	
phys. NaCl	30	22	87,0	10,9	
0,075 E S-FSH	30	25	176,4	34,4	
0,0375 E S-FSH	30	25	125,3	25,6	

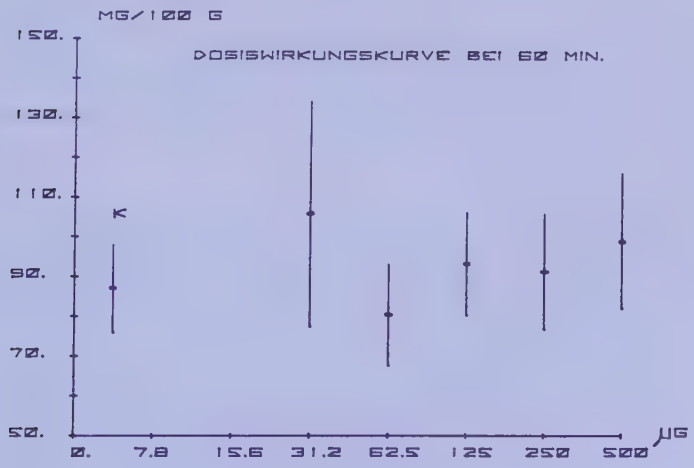


Abbildung 15:

Testgruppe 6, Dosiswirkungsbeziehung bei 150 Minuten:

a) immunologische Auswertung:

Tabelle 16 und 17, bzw. Abbildung 16 und 17 zeigen die Dosisabhängigkeit der FSH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen ovariektomierter Östrogen-Progesteron blockierter Wistar-Ratten 150 Minuten nach Gabe von Diazepam (Valium^{R}).

Man erkennt auf Abbildung 16, daß alle mittleren Serumwerte unterhalb der mittleren Kontrolle liegen; die Werte bei 62,5 und 31,25 µg Diazepam sind sogar signifikant erniedrigt. Die geringste FSH-Aktivität findet sich nach i.v.-Injektion von 500 µg Diazepam (höchste Dosis).

Der mittlere FSH-Hypophysengehalt bei den angewendeten Dosen liegt generell über dem Kontrollmittelwert. Die Werte zwischen 7,8 µg und 125 µg sind dabei signifikant erhöht. Der größte FSH-Hypophysengehalt liegt bei der Gruppe vor, die 62,5 µg Diazepam gespritzt bekam.

Den größtenteils gegenüber der Kontrolle signifikant verringerten FSH-Serumkonzentrationen stehen die mehrheitlich signifikant erhöhten FSH-Hypophysengehalte gegenüber. Der im Vergleich zu den übrigen Konzentrationen geringen FSH-Serumkonzentration bei 500 µg entspricht kein gegenüber der Kontrolle signifikant erhöhter FSH-Hypophysengehalt.

b) biologische Auswertung:

Im biologischen FSH-Test liegen alle mittleren FSH-Serumkonzentrationen (Abb. 18) signifikant über dem mittleren Kontrollwert. Die FSH-Konzentration ist bei 62,5 µg am größten und bei 31,25 µg Diazepam am kleinsten.

Tabelle 16:

FSH-Immunoassay, Dosiswirkungsbeziehung bei 150 Minuten:

Seren

Dosis (10^{-6}g)	bei (min)	Anzahl der Tiere	X (10^{-9}g/ml)	s_x	Signifikanz gegen Kontrolle
500	150	23	1775,5	700,4	+ IW < 0,5 %
250	150	35	1929,6	422,1	+ IW < 0,5 %
125	150	11	1863,7	182,9	+ IW < 0,5 %
62,5	150	10	2023,1	459,4	- IW > 5,0 %
31,25	150	21	2043,9	374,5	- IW < 2,5 %
15,6	150	11	1917,6	304,1	+ IW < 0,5 %
7,8	150	12	2078,7	314,8	- IW > 1,0 %
phys. NaCl	30	20	2292,3	249,7	

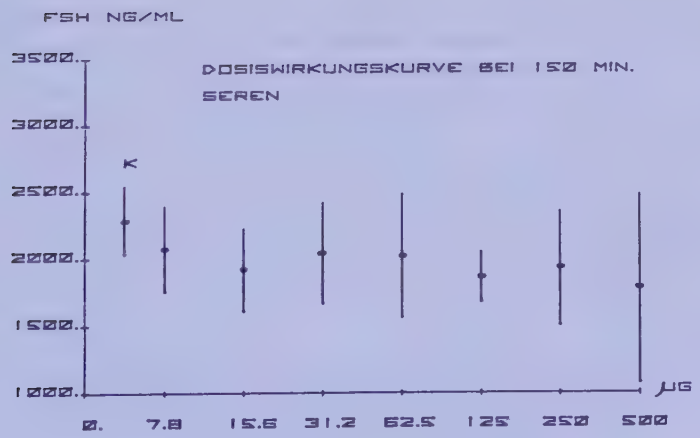


Abbildung 16:

Tabelle 17:

FSH-Immunoassay, Dosiswirkungsbeziehung bei 150 Minuten:

Hypophysen

Dosis (10^{-6}g)	bei (min)	Anzahl der Tiere	X (10^{-6}g/Hy)	s_x	Signifikanz gegen Kontrolle
500	150	24	414,7	92,9	- IW > 2,5 %
250	150	35	402,6	87,0	- IW > 2,5 %
125	150	12	486,6	119,0	+ IW < 0,5 %
62,5	150	10	546,9	78,2	+ IW < 0,5 %
31,25	150	22	500,2	124,0	+ IW < 0,5 %
15,6	150	12	522,5	109,9	+ IW < 0,5 %
7,8	150	11	483,9	59,9	+ IW < 0,5 %
phys. NaCl	30	20	312,0	162,6	

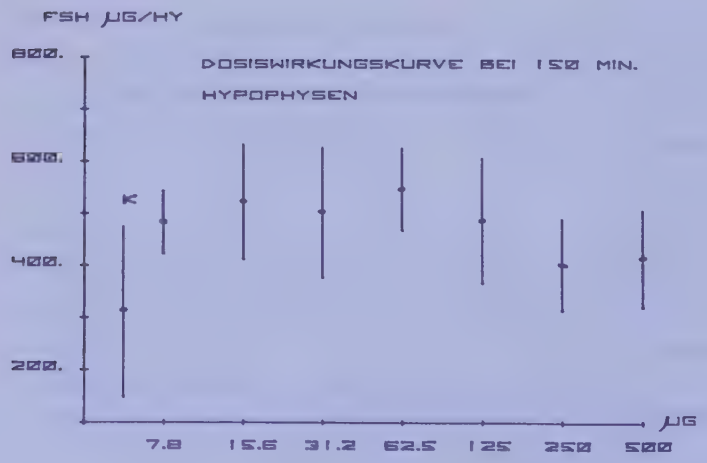


Abbildung 17:

Tabelle 18:

FSH-Biologische Tests, Dosiswirkungsbeziehung bei 150 Minuten:

Seren

Dosis (10^{-6} g)	bei (min)	Anzahl der Tiere	Ovargew. 100 g Tiergew. $\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	Signifikanz gegen Kontrolle
500	150	10	124,7	23,1	+ IW < 0,5 %
250	150	19	120,4	25,5	+ IW < 0,5 %
125	150	5	113,8	17,2	+ IW < 0,5 %
62,5	150	5	127,6	13,4	+ IW < 0,5 %
31,25	150	5	111,0	9,7	+ IW < 0,5 %
15,6	150	5	113,0	16,2	+ IW < 0,5 %
7,8	150	5	124,2	10,2	+ IW < 0,5 %
phys. NaCl	30	22	87,0	10,9	
0,075 E S-FSH	30	25	176,4	34,4	
0,0375 E S-FSH	30	25	125,3	25,6	

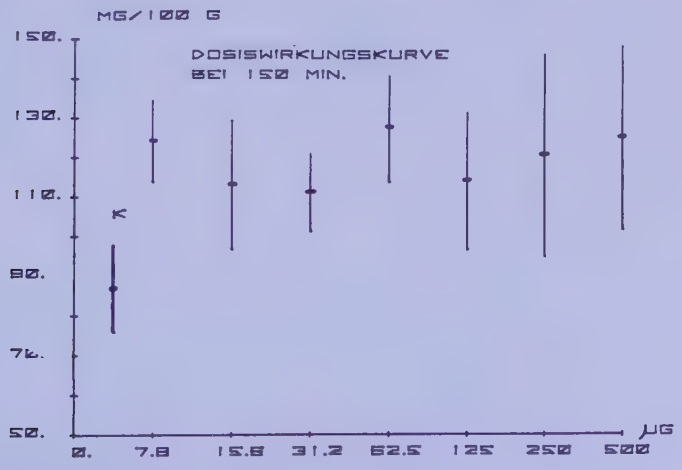


Abbildung 18:

Testgruppe 7, Kinetik bei 250 µg Diazepam:

a) immunologische Auswertung:

Tabelle 19 und 20, bzw. Abbildung 19 und 20 zeigen die zeitliche Abhängigkeit der FSH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen nach intravenöser Injektion von 250 µg Diazepam.

Die mittleren FSH-Serumwerte liegen fast alle im Kontrollbereich. Nur 15, 150 und 390 Minuten post injectionem ergeben sich signifikant erniedrigte Werte.

Aus Abb. 20 ist zu ersehen, daß der mittlere FSH-Gehalt der Hypophysen bei nahezu allen Zeiten im Bereich der Kontrollgruppe liegt. Die Mittelwerte der Dosisgruppen sind zwar größer als der Mittelwert der Kontrollgruppe, aber mit Ausnahme der 15-, 270- und 300 Minuten-Gruppe nicht signifikant verschieden.

15 Minuten nach Verabreichung von Diazepam ist die mittlere FSH-Konzentration des Serums gegenüber der Kontrolle erniedrigt und der mittlere FSH-Gehalt der Hypophysen gegenüber der Kontrolle erhöht.

b) biologische Auswertung:

Im biologischen FSH-Test (Tab. 21, Abb. 21) liegen mit einer Ausnahme alle mittleren Serumkonzentrationen über dem mittleren Kontrollwert, zum Teil signifikant.

Tabelle 19:

FSH-Immunoassay, Kinetik bei 250 µg Diazepam:

Seren

Dosis (10^{-6} g)	bei (min)	Anzahl der Tiere	$\bar{x}$ (10^{-9} g/ml)	$s_{\bar{x}}$	Signifikanz gegen Kontrolle
250	15	11	1930,7	288,7	+ IW < 0,5 %
250	30	19	2229,2	659,7	- IW > 25,0 %
250	60	19	2435,3	616,5	- IW > 5,0 %
250	90	11	2387,2	391,8	- IW > 5,0 %
250	120	18	2153,2	330,8	- IW > 5,0 %
250	150	35	1929,6	422,1	+ IW < 0,5 %
250	180	11	2386,8	289,5	- IW > 5,0 %
250	210	12	2429,6	629,7	- IW > 5,0 %
250	240	10	2219,7	354,0	- IW > 25,0 %
250	270	12	2225,5	304,2	- IW > 25,0 %
250	300	12	2629,2	446,9	- IW < 2,5 %
250	330	12	2470,3	505,5	- IW > 5,0 %
250	360	11	2318,0	327,4	- IW > 25,0 %
250	390	10	1902,3	379,8	+ IW < 0,5 %
250	420	12	2469,4	625,7	- IW > 5,0 %
phys. NaCl	30	20	2292,3	249,7	

Tabelle 20:

FSH-Immunoassay, Kinetik bei 250 µg Diazepam:

Hypophysen

Dosis (10^{-6}g)	bei (min)	Anzahl der Tiere	$\bar{x}$ (10^{-6}g/Hy)	$s_{\bar{x}}$	Signifikanz gegen Kontrolle
250	15	12	588,5	203,0	+ IW < 0,5 %
250	30	11	354,0	69,4	- IW > 5,0 %
250	60	16	393,9	86,3	- IW < 5,0 %
250	90	11	443,4	91,5	- IW < 1,0 %
250	120	24	409,7	131,2	- IW < 2,5 %
250	150	35	402,6	87,0	- IW < 2,5 %
250	180	17	322,5	88,9	- IW > 25,0 %
250	210	11	358,1	67,0	- IW > 5,0 %
250	240	17	274,6	63,4	- IW > 5,0 %
250	270	12	535,5	125,4	+ IW < 0,5 %
250	300	11	668,7	91,6	+ IW < 0,5 %
250	330	11	427,6	103,5	- IW < 2,5 %
250	360	11	384,2	73,2	- IW > 5,0 %
250	390	11	428,0	87,5	- IW < 2,5 %
250	420	11	412,9	74,4	- IW < 2,5 %
phys. NaCl	30	20	312,0	162,6	

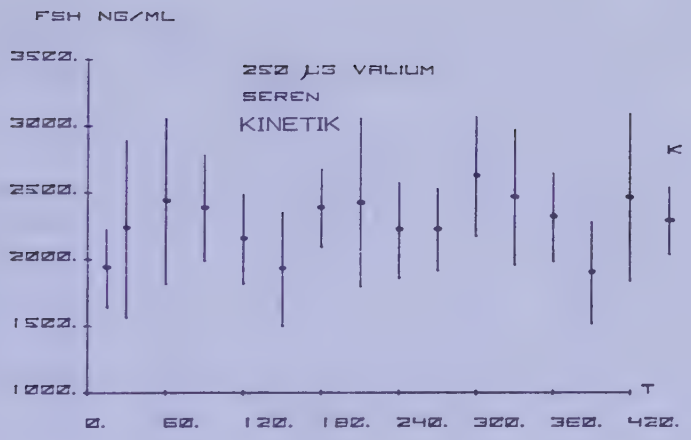


Abbildung 19:

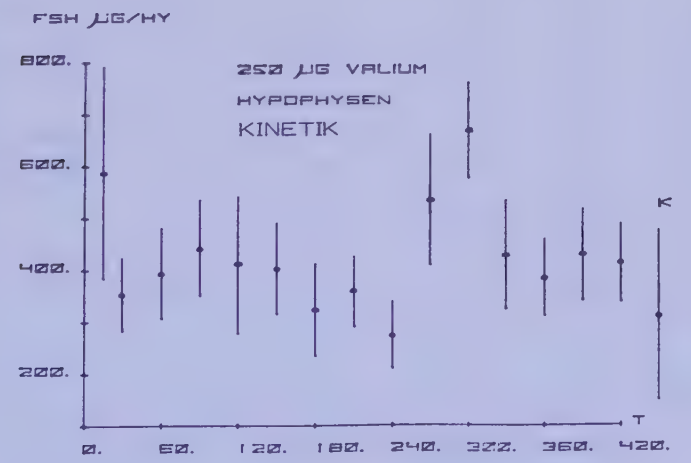


Abbildung 20:

Tabelle 21:

FSH-Biologische Tests, Kinetik bei 250 µg Diazepam:

Seren

Dosis (10^{-6} g)	bei (min)	Anzahl der Tiere	$\bar{x}$ Ovargew. / 100 g Tiergew.	s_x	Signifikanz gegen Kontrolle
250	15	5	84,0	13,4	- IW > 25,0 %
250	30	9	87,5	13,2	- IW > 25,0 %
250	60	9	91,3	14,4	- IW > 5,0 %
250	90	5	96,4	12,5	- IW > 5,0 %
250	120	13	93,5	10,3	- IW > 5,0 %
250	150	19	120,4	25,5	+ IW < 0,5 %
250	180	10	101,6	9,2	+ IW < 0,5 %
250	210	5	110,8	27,2	- IW > 2,5 %
250	240	5	101,9	12,3	+ IW < 0,5 %
250	270	5	100,6	9,3	- IW < 1,0 %
250	300	5	102,8	21,6	- IW > 2,5 %
250	330	5	136,0	13,5	+ IW < 0,5 %
250	360	4	134,0	28,8	+ IW < 0,5 %
250	390	4	99,0	10,7	- IW > 2,5 %
250	420	5	109,2	12,9	+ IW < 0,5 %
phys. NaCl	30	22	87,0	10,9	
0,075 E S-FSH	30	25	176,4	34,4	
0,0375 E S-FSH	30	25	125,3	25,6	

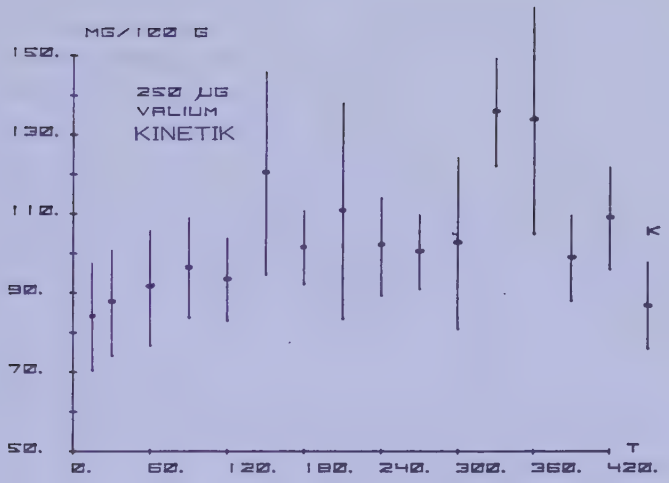


Abbildung 21:

Testgruppe 8, Kinetik bei 31,25 µg Diazepam:

a) immunologische Auswertung:

Tabelle 22 und 23, bzw. Abbildung 22 und 23 zeigen die zeitliche Abhängigkeit der FSH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen nach intravenöser Injektion von 31,25 µg Diazepam.

Die mittleren FSH-Serumwerte liegen bis 300 Minuten post injectionem unter, nach 300 Minuten über der Kontrolle. Eine signifikante Abweichung von der Kontrolle besteht 120-, 150-, 300- und 420 Minuten nach der Diazepamapplikation.

Aus Abb. 23 geht hervor, daß der mittlere hypophysäre FSH-Gehalt der Dosisgruppen bei fast allen Zeiten größer ist als derjenige der Kontrollgruppe; 150-, 330-, 390- und 420 Minuten p.i. ist der Unterschied signifikant.

Tabelle 22:

FSH-Immunoassay, Kinetik bei 31,25 µg Diazepam:

Seren

Dosis (10^{-6}g)	bei (min)	Anzahl der Tiere	X (10^{-9}g/ml)	s_x	Signifikanz gegen Kontrolle
31,25	15	12	2118,2	293,8	- IW > 2,5 %
31,25	30	12	1861,7	660,0	- IW < 2,5 %
31,25	60	22	2196,0	412,6	- IW > 5,0 %
31,25	90	12	2120,1	270,6	- IW > 2,5 %
31,25	120	8	1939,9	259,0	+ IW < 0,5 %
31,25	150	21	2043,9	374,5	- IW < 2,5 %
31,25	180	12	1995,8	480,7	- IW > 2,5 %
31,25	210	9	1952,0	385,0	+ IW < 0,5 %
31,25	240	11	2040,1	264,9	- IW < 1,0 %
31,25	270	11	1976,4	253,2	- IW < 1,0 %
31,25	300	8	1967,8	258,7	+ IW < 0,5 %
31,25	330	11	2422,0	265,9	- IW > 25,0 %
31,25	360	11	2644,9	516,8	- IW > 1,0 %
31,25	390	11	2623,2	510,6	- IW > 5,0 %
31,25	420	12	2759,8	494,6	+ IW < 0,5 %
phys. NaCl	30	20	2292,3	249,7	

Tabelle 23:

FSH-Immunoassay, Kinetik bei 31,25 µg Diazepam:

Hypophysen

Dosis (10^{-6}g)	bei (min)	Anzahl der Tiere	$\bar{x}$ (10^{-6}g/Hy)	$s_{\bar{x}}$	Signifikanz gegen Kontrolle
31,25	15	12	399,9	97,6	- IW < 5,0 %
31,25	30	12	419,1	128,6	- IW < 5,0 %
31,25	60	22	284,0	81,7	- IW > 5,0 %
31,25	90	12	323,6	67,2	- IW > 25,0 %
31,25	120	10	352,5	75,6	- IW > 5,0 %
31,25	150	22	500,2	124,0	+ IW < 0,5 %
31,25	180	12	417,3	81,6	- IW < 2,5 %
31,25	210	12	407,7	105,7	- IW > 5,0 %
31,25	240	11	369,6	95,0	- IW < 5,0 %
31,25	270	11	438,4	102,6	- IW < 2,5 %
31,25	300	12	357,5	156,8	- IW > 5,0 %
31,25	330	11	443,3	69,1	+ IW < 0,5 %
31,25	360	12	461,6	130,7	- IW < 1,0 %
31,25	390	10	564,1	120,6	+ IW < 0,5 %
31,25	420	12	655,3	133,7	+ IW < 0,5 %
phys. NaCl	30	20	312,0	162,6	

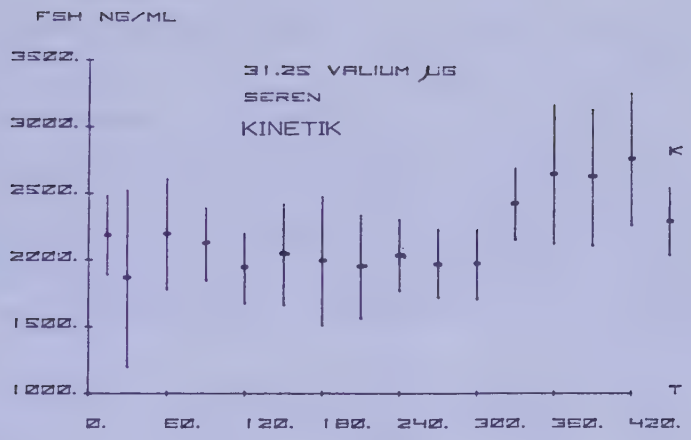


Abbildung 22:

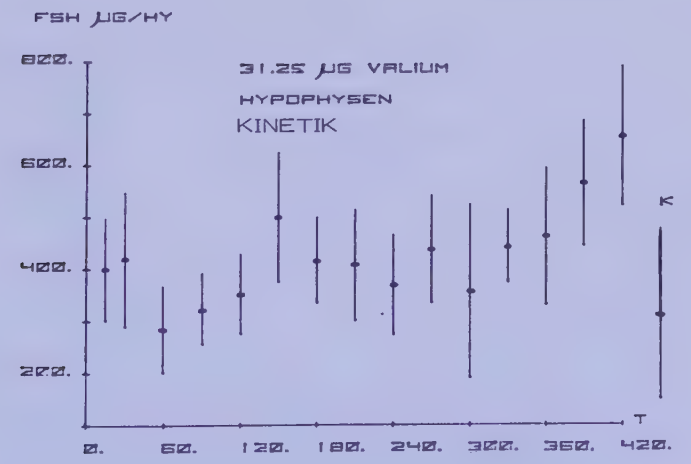


Abbildung 23:

Testgruppe 9, Kinetik bei 0,01 µg LH-RH:

a) immunologische Auswertung:

Tabelle 24 und Abbildung 24 zeigen die zeitliche Abhängigkeit der LH-Aktivität im Plasma nach intravenöser Injektion von 0,01 µg LH-RH.

Die mittleren LH-Serumkonzentrationen der Dosisgruppen liegen bis 30 Minuten post injectionem signifikant über der mittleren Serumkonzentration der Kontrolle. Die höchste LH-Konzentration wird nach 15 Minuten erreicht. Eine signifikante Erhöhung ist auch noch 60 Minuten, nicht aber 45 Minuten p.i. nachweisbar. Später liegen die LH-Serumkonzentrationen der Dosisgruppen im Kontrollbereich.

Tabelle 24:

LH-Immunoassay, Kinetik bei 0,01 µg LH-RH:

Seren

Dosis (0,01 µg LH-RH)	bei (min)	Anzahl der Tiere	$\bar{x}$ (10^{-9} g/ml)	$s_{\bar{x}}$	Signifikanz gegen Kontrolle
0,01 µg	5	12	671,6	227,1	+ IW < 0,5 %
0,01 µg	10	8	616,9	118,4	+ IW < 0,5 %
0,01 µg	15	9	731,2	111,9	+ IW < 0,5 %
0,01 µg	30	8	421,1	91,7	+ IW < 0,5 %
0,01 µg	45	8	217,1	55,6	- IW > 1,0 %
0,01 µg	60	9	278,5	92,7	+ IW < 0,5 %
0,01 µg	90	9	207,9	47,8	- IW > 2,5 %
0,01 µg	120	8	142,8	40,1	- IW > 5,0 %
phys. NaCl	30	19	158,2	52,0	

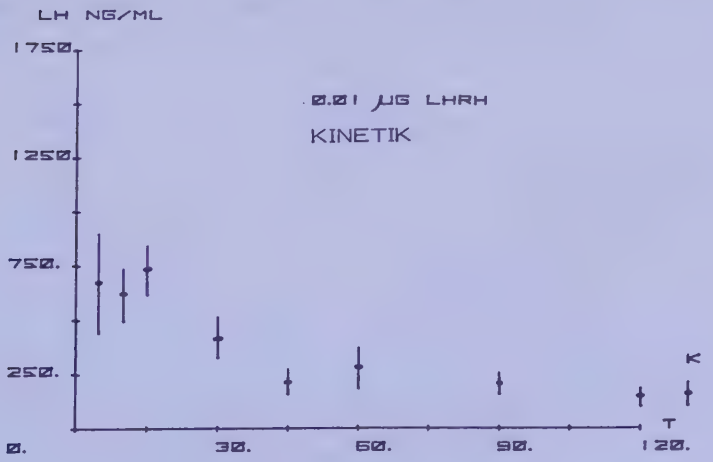


Abbildung 24:

Testgruppe 10, Kinetik bei 0,01 µg LH-RH + 250 µg Diazepam:

a) immunologische Auswertung:

Tabelle 25 und 26, bzw. Abbildung 25 und 26 zeigen die zeitliche Abhängigkeit der LH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen nach intravenöser Injektion von 0,01 µg LH-RH und 250 µg Diazepam.

Die gefundenen mittleren LH-Serumkonzentrationen liegen bis 60 Minuten p.i. signifikant über den Kontrollwerten, nach 60 Minuten im Kontrollbereich (s. Abb. 25).

Abbildung 26 zeigt, daß der mittlere LH-Gehalt der Hypophysen bei allen Versuchsgruppen signifikant gegenüber dem mittleren hypophysären LH-Gehalt der Kontrollgruppe erniedrigt ist. Den geringsten hypophysären LH-Gehalt kann man 10 Minuten nach der Diazepam-Applikation feststellen.

b) biologische Auswertung:

Der biologische LH-Test weist eine Ascorbinsäureverarmung zwischen 1,6 und 15 % auf. Die prozentuale Verarmung ist 45 Minuten p.i. am stärksten und nimmt dann allmählich ab (Tab. 27, Abb. 27).

Tabelle 25:

LH-Immunoassay, Kinetik bei 0,01 µg LH-RH + 250 µg Diazepam:

Seren

Dosis	bei (min)	Anzahl der Tiere	$\bar{x}$ (10^{-9} g/ml)	$s_{\bar{x}}$	Signifikanz gegen Kontrolle
250 µg Valium + 0,01 µg LH-RH	10	7	1264,1	498,9	+ IW < 0,5 %
	15	6	855,4	187,0	+ IW > 0,5 %
	30	7	709,1	250,4	+ IW > 0,5 %
	45	7	393,2	137,1	+ IW < 0,5 %
	60	7	378,3	168,0	+ IW < 0,5 %
	90	6	204,2	43,7	- IW > 5,0 %
	120	7	187,8	57,9	- IW > 5,0 %
	150	7	157,4	53,0	- IW > 25,0 %
	180	6	176,1	115,4	- IW > 25,0 %
	210	7	159,6	80,7	- IW > 25,0 %
	240	6	121,3	34,1	- IW > 25,0 %
phys. NaCl	30	19	158,2	52,0	

Tabelle 26:

LH-Immunoassay, Kinetik bei 0,01 µg LH-RH + 250 µg Diazepam:

Hypophysen

Dosis	bei (min)	Anzahl der Tiere	$\bar{x}$ (10^{-6}g/Hy)	$s_{\bar{x}}$	Signifikanz gegen Kontrolle
250 µg Valium +	10	7	632,1	248,7	+ IW < 0,5 %
	15	7	734,2	210,6	+ IW < 0,5 %
0,01 µg Lh-RH	30	6	686,6	90,5	+ IW < 0,5 %
	45	7	786,4	126,5	+ IW < 0,5 %
"	60	7	742,2	305,2	+ IW < 0,5 %
"	90	7	737,0	285,1	+ IW < 0,5 %
"	120	7	649,7	168,9	+ IW < 0,5 %
"	150	6	776,1	211,8	+ IW < 0,5 %
"	180	7	708,1	244,6	+ IW < 0,5 %
"	210	7	694,7	137,3	+ IW < 0,5 %
"	240	7	644,9	111,5	+ IW < 0,5 %
phys. NaCl	30	15	1184,5	183,0	

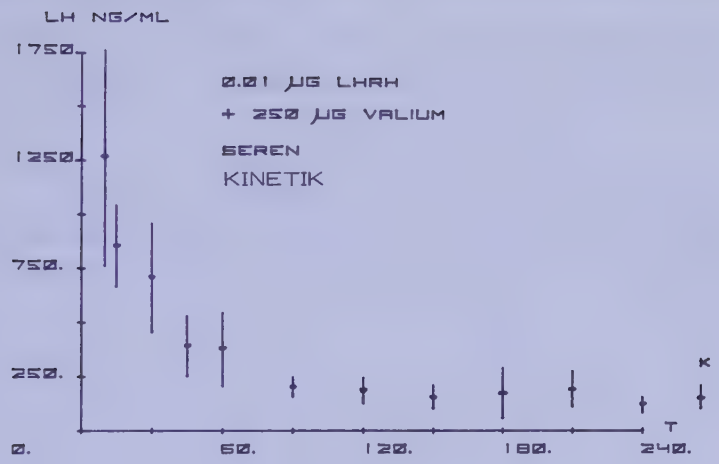


Abbildung 25:

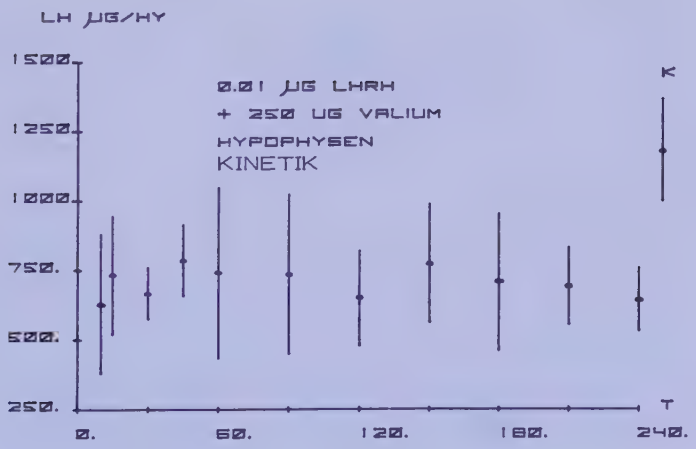


Abbildung 26:

Tabelle 27:

LH-Biologische Tests, Kinetik bei 0,01 µg LH-RH + 250 µg Diazepam:

Dosis	bei (min)	Anzahl der Tiere	% OAAD $\bar{x}$
250 µg Valium +	30	4	11,4
	45	4	15,0
0,01 µg LH-RH	90	4	8,9
	150	4	5,6
"	240	4	1,6

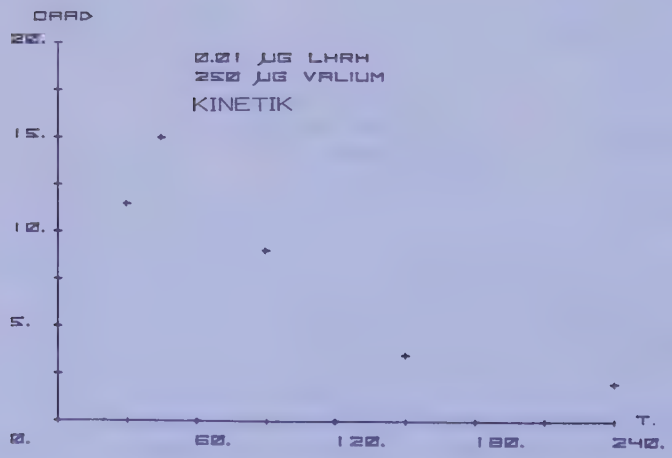


Abbildung 27:

Testgruppe 11, Kinetik bei 0,01 µg LH-RH

a) immunologische Auswertung:

Tabelle 28 und Abbildung 28 zeigen die zeitliche Abhängigkeit der FSH-Aktivität im Plasma nach intravenöser Injektion von 0,01 µg LH-RH.

In Abb. 28 erkennt man, daß alle mittleren FSH-Serumkonzentrationen der Dosisgruppen über dem Mittelwert der Kontrollgruppe liegen. Ein signifikanter Unterschied läßt sich aber nur 60 Minuten nach der LH-RH Verabreichung feststellen.

Tabelle 28:

FSH-Immunoassay, Kinetik bei 0,01 µg LH-RH:

Seren

Dosis	bei (min)	Anzahl der Tiere	$\bar{x}$ (10^{-9} g/ml)	$s_{\bar{x}}$	Signifikanz gegen Kontrolle
0,01 µg LH-RH	5	13	2583,9	506,4	- IW > 2,5 %
"	10	8	2429,5	201,0	- IW > 5,0 %
"	15	13	2554,2	357,9	- IW > 1,0 %
"	30	14	2392,0	406,9	- IW > 5,0 %
"	45	14	2384,7	435,5	- IW > 5,0 %
"	60	9	2678,6	378,1	+ IW < 0,5 %
"	90	9	2591,5	412,3	- IW > 2,5 %
"	120	8	2303,4	673,3	- IW > 25,0 %
phys. NaCl	30	20	2292,3	249,7	

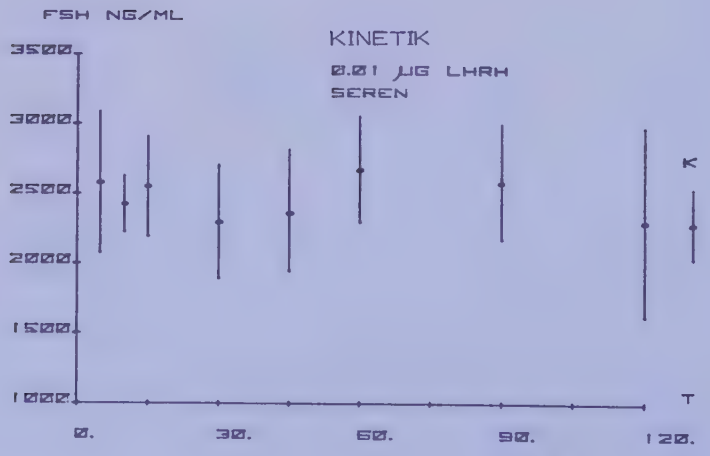


Abbildung 28:

Testgruppe 12, Kinetik bei 0,01 µg LH-RH + 250 µg Diazepam:

a) immunologische Auswertung:

Tabelle 29 und 30, bzw. Abbildung 29 und 30 zeigen die zeitliche Abhängigkeit der FSH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen nach intravenöser Injektion von 0,01 µg LH-RH und 250 µg Diazepam.

Die mittleren FSH-Serumkonzentrationen liegen mit einer Ausnahme alle über dem Kontrollwert. Die Werte sind aber nicht signifikant erhöht. Wie aus Tab. 29 zu erkennen, ist die FSH-Serumkonzentration 60 Minuten nach intravenöser Injektion am größten.

Abb. 30 zeigt, daß der mittlere FSH-Hypophysengehalt der einzelnen Versuchsgruppen im Bereich der Kontrolle liegt.

b) biologische Auswertung:

Aus Tabelle 31 geht hervor, daß alle mittleren FSH-Serumkonzentrationen über dem mittleren Kontrollwert liegen, z.T. signifikant.

Tabelle 29:

FSH-Immunoassay, Kinetik bei 0,01 µg LH-RH + 250 µg Diazepam:

Seren

Dosis	bei	Anzahl der	$\bar{x}$ (10^{-9} g/ml)	$s_{\bar{x}}$	Signifikanz gegen Kontrolle
250 µg Valium + 0,01 µg LH-RH	10	7	2624,3	389,7	- IW < 1,0 %
	15	7	2334,4	428,8	- IW > 25,0 %
	30	7	2476,6	608,8	- IW > 5,0 %
	45	7	2684,0	492,3	- IW > 2,5 %
	60	7	2762,9	504,0	- IW > 2,5 %
	90	7	2547,0	580,5	- IW > 5,0 %
	120	7	2315,4	901,8	- IW > 25,0 %
	150	7	2178,4	748,0	- IW > 25,0 %
	180	7	2533,9	582,3	- IW > 5,0 %
	210	6	2527,7	719,6	- IW > 5,0 %
	240	6	2560,1	219,5	- IW > 2,5 %
phys. NaCl	30	20	2292,3	249,7	

Tabelle 30:

FSH-Immunoassay, Kinetik bei 0,01 µg LH-RH + 250 µg Diazepam:

Hypophysen

Dosis	bei (min)	Anzahl der Tiere	$\bar{x}$ (10^{-6} g/Hy)	$s_{\bar{x}}$	Signifikanz gegen Kontrolle
250 µg Valium + 0,01 µg LH-RH	10	7	283,5	52,1	- IW > 25,0 %
	15	7	333,6	61,9	- IW > 25,0 %
	30	7	270,9	21,4	- IW > 5,0 %
"	45	7	301,9	72,2	- IW > 25,0 %
"	60	7	267,7	49,8	- IW > 5,0 %
"	90	7	268,3	50,8	- IW > 5,0 %
"	120	7	316,6	48,0	- IW > 25,0 %
"	150	7	312,5	46,0	- IW > 25,0 %
"	180	7	318,8	21,8	- IW > 25,0 %
"	210	7	237,5	74,3	- IW > 5,0 %
"	240	7	199,4	26,0	- IW > 1,0 %
phys. NaCl	30	20	312,0	162,6	

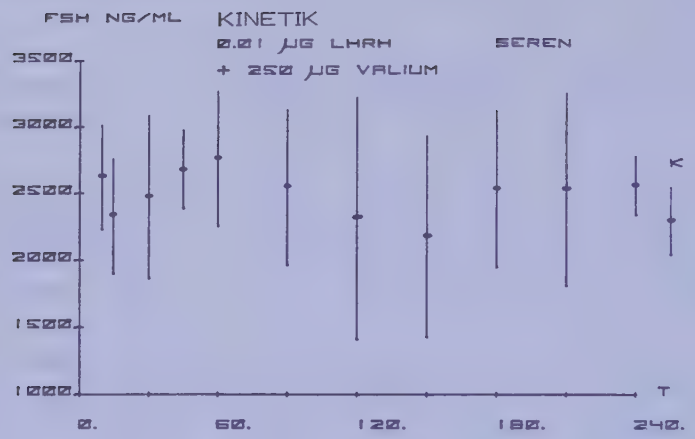


Abbildung 29:

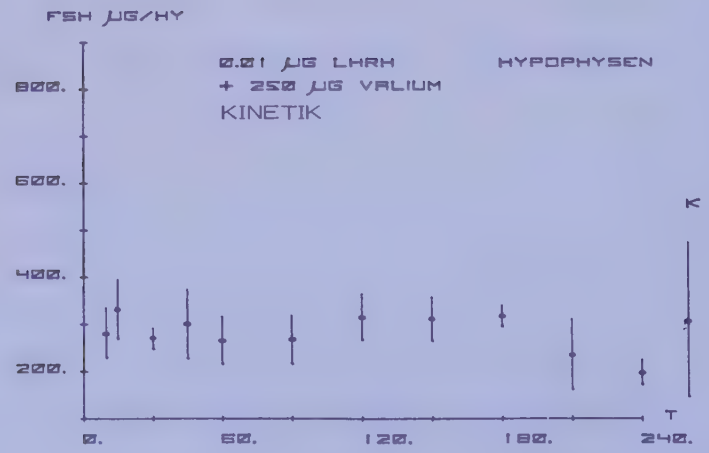


Abbildung 30:

Tabelle 31:

Biologischer FSH-Test, Kinetik bei 0,01 µg LH-RH + 250 µg Diazepam:

Seren

Dosis	bei (min)	Anzahl der Tiere	$\bar{x}$ Ovargew. / 100 g Tiergew.	$s_{\bar{x}}$	Signifikanz gegen Kontrolle
250 µg Valium + 0,01 µg LH-RH	10	5	92,4	21,9	- IW > 25,0 %
	15	5	91,0	4,4	- IW > 25,0 %
	30	5	122,4	8,3	+ IW < 0,5 %
"	45	5	110,7	19,8	- IW > 1,0 %
"	60	5	112,5	19,3	- IW > 1,0 %
"	90	5	103,9	12,3	+ IW < 0,5 %
"	120	5	99,2	14,6	- IW < 5,0 %
"	150	5	102,6	11,7	- IW > 1,0 %
"	180	5	103,6	5,3	+ IW < 0,5 %
"	210	5	106,8	16,8	+ IW < 0,5 %
"	240	5	100,1	12,8	- IW > 2,5 %
phys. NaCl	30	22	87,9	10,8	

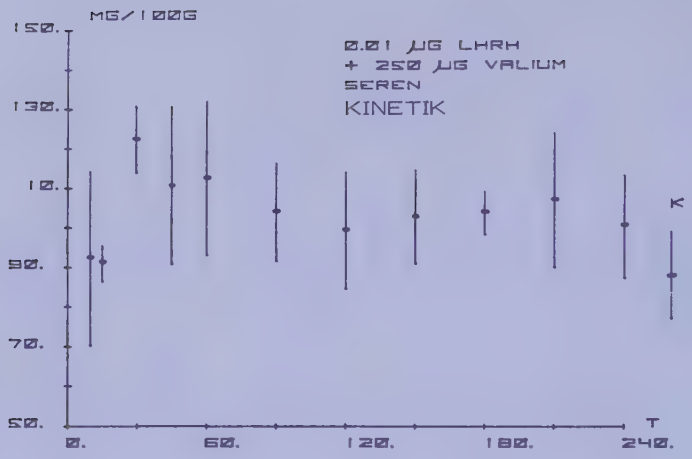


Abbildung 31:

E DISKUSSION

Die Benzodiazepine verändern die Spiegel und den Metabolismus der biogenen Hirnamine wie Norepinephrin, Serotonin und Dopamin fast nicht (GARATTINI, MUSSINI und RANDALL, 1973 b; SCHALLEK, SCHLOSSER und RANDALL, 1972; ZBINDEN und RANDALL, 1967). Es gibt aber Hinweise in der Literatur, daß das cholinerge System mit der Wirkung der Benzodiazepine interferiert:

- Benzodiazepine antagonisieren die Effekte wie Krämpfe und muskuläre Aktivität verschiedener Cholinesterasehemmer (GATTI, BONAVOGLIA und MICHALEK, 1973; JOHNSON und LOWNDES, 1974; LIPP et al., 1973).

- Benzodiazepine antagonisieren Penthylentetrazol induzierte Krämpfe (ZBINDEN und RANDALL, 1967).
  Möglicherweise stimuliert dieses Mittel das cholinerge System. Penthylentetrazol verminderte die Acetylcholinspiegel im Rattenhirn (GIARMAN und PEPEU, 1962; LONGONI, MULAS und PEPEU, 1974) und verursachte eine massive Freisetzung von Acetylcholin aus der Rattenhirnrinde (MITCHEL 1963; BELESLIN, POLAK und SPROULL, 1965; GARDNER und WEBSTER, 1973; HEMSWORTH und NEAL, 1968). Die krampfauslösende Wirkung wird durch die Gabe von Anticholinesterase gesteigert (GREEN, 1964).

- Direkte Messungen biochemischer cholinerger Parameter liefern einige Hinweise darauf, daß die Benzodiazepine cholinerge Neurone hemmen. Diazepam erhöht die Acetylcholinspiegel sowohl in den Synaptosomen der Hirnrinde des Meerschweinchens (ESSMAN, 1973) als auch im Mäuse- und Rattenhirn, ohne die Cholinspiegel zu beeinflussen (CONSOLO, LADINSKY, PERI und GARATTINI, 1972; CONSOLO, LADINSKY, PERI und GARATTINI, 1974 b; LADINSKY, CONSOLO, PERI und GARATTINI, 1973). Im gesamten Gehirn der Maus vermindert sich der Acetylcholinumsatz unter Diazepam (CHENEY, TRABUCCHI, HANIN und COSTA, 1973).

Möglicherweise blockiert Diazepam den Release von Acetylcholin (CONSOLO et al., 1974 b).

CONSOLO, GARATTINI und LADINSKY (1975) untersuchten die Wirkung von Diazepam auf Acetylcholin und die Cholinspiegel im gesamten Gehirn bei drei verschiedenen Tierarten. Der Anstieg der Acetylcholinspiegel im Gehirn dauerte bei der Maus mindestens 260 Minuten an, bei der Ratte etwa 60 Minuten. Beim Meerschweinchen war im Gehirn keine Acetylcholinerhöhung feststellbar. Bei allen drei Arten kam es zu keiner Cholinspiegelerhöhung.

Es läßt sich somit keine klare Beziehung zwischen der Konzentration von Diazepam oder seiner Metaboliten im Gehirn und ihrer Wirkung auf Acetylcholin bei allen drei Tierarten aufzeigen.

Neben dem hauptsächlichen Anstieg des Acetylcholins in den Hemisphären des Mäusegehirns, der 240 Minuten andauerte, stieg der Acetylcholinspiegel auch im Diencephalon an, war aber nach 30 Minuten wieder vorbei. Ein Anstieg des Acetylcholin durch Diazepam war auch bei der Ratte auf die hemisphärischen Strukturen beschränkt (Striatum, Hippocampus). 15 Minuten nach der intravenösen Verabreichung von Diazepam wurden die höchsten Acetylcholinspiegel gemessen. Nach einer Stunde war die Wirkung schon nicht mehr signifikant.

Einige andere Benzodiazepine, wie Lorazepam, Nitrazepam, ebenso wie die Metaboliten von Diazepam, erhöhten gleichfalls die Acetylcholinspiegel in den Rattenhemisphären 15 Minuten nach intravenöser Gabe von 5 mg pro kg Körpergewicht. Zwischen den verschiedenen Benzodiazepinen waren keine großen Unterschiede zu beobachten und zwischen der Wirkung auf Acetylcholin und dem Grad der Muskelrelaxation fanden sich keine Zusammenhänge.

Die peripheren Cholin- und Acetylcholinspiegel blieben bei Gabe von Diazepam unverändert. CONSOLO, GARATTINI und LADINSKY (1975) untersuchten auch die Effekte von Diazepam auf die verschiedenen

biogenen Amine des Gehirns um die Spezifität dieses Stoffes zu bestimmen. 30 Minuten nach Diazepamgabe waren bei Ratten die Konzentrationen von Serotonin, Norepinephrin und Dopamin unverändert geblieben und auch die Metaboliten dieser biogenen Amine wiesen keine Konzentrationsänderung auf.

Offenbar beeinträchtigt Diazepam nur die Gleichtgewichtskonzentration von Acetylcholin und zwar im Moment der Anwendung.

Der deutliche Anstieg von Acetylcholin im Striatum nach Diazepamgabe erinnerte an ähnliche Konzentrationserhöhungen nach Anwendung der Dopaminagonisten Amphetamin, L-Dopa, Apormorphin und Piribedil (CONSOLO, LADINSKY und GARATTINI, 1974 a). Diazepam ändert nicht die Homovannilinmandelsäure-Gleichgewichtskonzentration im Striatum, während die direkten Dopaminagonisten, wie Apomorphin und Piribedil, sie senken und indirekte Agonisten, wie Amphetamin und L-Dopa sie erhöhten (CONSOLO, FANELLI, GARATTINI, GHEZZI, JORI, LADINSKY, MARC und SAMANIN, 1975). Zentrale dopaminerge Agonisten erhöhten im Gegensatz zu Diazepam spezifisch die striären Acetylcholinspiegel ohne das hippocampale oder hemisphärische Acetylcholin zu beeinflussen (GUYENET, AGID, JAVOY, BEAUJOUAN und GLOWINSKY, 1974; LADINSKY, CONSOLO und GARATTINI, 1974; SETHY und VAN WOERT, 1974). Dopaminantagonisten wie Pimozide senkten das striäre Acetylcholin und verhinderten den durch Dopaminagonisten, wie Apomorphin, induzierten Anstieg. Dagegen konnte Pimozide die Wirkung von Diazepam auf das striäre Acetylcholin nicht verhindern. Die durch Pimozidebehandlung gesenkten Acetylcholinspiegel wurden durch Diazepam erhöht. Diese Ergebnisse machen deutlich, daß das dopaminerge System höchstwahrscheinlich nicht beeinflußt wird bei Diazepamgabe.

Der Anstieg der Acetylcholin nach Diazepamverabreichung beruht nicht auf einer direkten Beeinflussung der Enzyme des Acetylcholinstoffwechsels, da jene in ihrer Aktivität und Konzentration nicht verändert waren.

CONSOLO, LADINSKY und GARATTINI (1975) versuchten zwischen den pharmakologischen Wirkungen von Diazepam und den Veränderungen im Gehirnacetylcholinspiegel Beziehungen aufzuzeigen: Die Abnahme der muskelrelaxierenden Wirkung geht mit der Abnahme des striären Acetylcholins parallel. Der Antagonismus des Diazepams gegenüber Pentylentetrazol hängt, im Bezug auf die Krämpfe, in seiner Dauer von der verwendeten Tierart ab. Der antikonvulsive Effekt von Diazepam hielt bei Ratten mindestens zwei Stunden an, d.h. der Effekt dauerte länger als die Wirkung von Diazepam auf die Gehirn-Acetylcholinspiegel. Die Interaktion von Pentylentetrazol mit Diazepam basiert sowohl auf der Muskelrelaxation als auch auf der biochemischen Ebene:

- Pentylentetrazol senkt spezifisch den Acetylcholinspiegel im Hippocampus.
- Pentylentetrazol vermag den durch Diazepam verursachten hippocampalen Acetylcholinanstieg nicht zu antagonisieren.
- Pentylentetrazol vermag am Striatum den Acetylcholinspiegel allein nicht zu verändern, wohl aber zusammen mit Diazepam zu senken.

Die Wirkung der Benzodiazepine auf das cholinerge System läßt sich in den folgenden Punkten zusammenfassen:

- Die Wirkung von Diazepam auf den Acetylcholinspiegel scheint spezifisch zu sein, da die Gleichgewichtskonzentrationen anderer Amine, wie Histamin, Serotonin, Norepinephrin und Dopamin, sowie deren Metaboliten unbeeinträchtigt bleiben.
- Die Benzodiazepine verminderten jedoch den Norepinephrinumsatz in einigen spezifischen Hirnarealen und den Dopaminumsatz im Corpus striatum (TAYLOR und LAVERTY, 1969). Diese Wirkung wird von BARTHOLINI, KELLER, PIERI und PLETSCHER (1973) der hypothermischen Wirkung von Diazepam zugeschrieben. DOTEUCHI und COSTA (1973) konnten unter experimentellen Be-

dingungen (Stress bei 4° C) eine verminderte Umsatzrate von Norepinephrin und Dopamin durch Diazepamgabe erzeugen.

- Die Tatsache, daß Diazepam die Acteylcholinspiegel nur in Hemisphärenstrukturen erhöht, paßt zu den elektrophysiologischen Untersuchungen von SCHALLEK, ZABRANSKY und KUEHN (1964), wonach die Wirkung von Diazepam im limbischen System lokalisiert ist, besonders in den Nn. amygdalae und dem Hippocampus.

- Der Anstieg der Gehirn-Acetylcholinspiegel, die von unveränderten Cholinspiegel, Acetyltransferase- und Cholinesteraseaktivitäten begleitet sind, veranlassen CONSOLO, GARATTINI und LADINSKY (1975) dazu anzunehmen, daß Diazepam die Freisetzung von Acetylcholin aus praeganglionären Nervenendigungen blokkiert. Diese Wirkung vermag auch die verminderte Umsatzrate vom Gehirn-Acetylcholin bei Diazepamgabe zu erklären (CHENEY et al., 1973) als Folge der Anreicherung dieses Amins in den Nervenendigungen.

- Der Anstieg des Acetylcholins in den Hemisphären nach Diazepamgabe beruht nicht auf einer Wirkung dieses Pharmakons über das dopaminerge System.

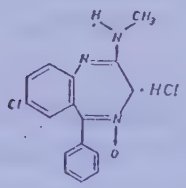
- POLC, MÖHLER und HAEFELY (1974) berichteten über eine Interaktion zwischen Diazepam und GABA auf spinaler Ebene. MAO, GUIDOTTI und COSTA (1975) nehmen an, daß Diazepam die Wirkung von GABA fördert. Die Autoren fanden eine Ähnlichkeit in der Wirkung von Diazepam und GABA im Cerebellum. Da GABA sehr wahrscheinlich der inhibitorische Transmitter in den Purkinjezellen des Cerebellum ist, spielt dieses Amin möglicherweise eine Rolle bei der antiepileptischen Wirkung von Diazepam. Es gibt aber keinen Hinweis darauf, daß das Cerebellum der primäre Angriffspunkt der Diazepamwirkung ist.

- Diazepam hat eine starke muskelrelaxierende, anxiolytische, aggressionshemmende und hypothermische Wirkung (SCHALLEK et al., 1972).

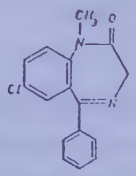
- Der Anstieg des striären Acetylcholin und die Dauer der muskelrelaxierenden Wirkung von Diazepam bei Ratten gingen parallel. Andererseits konnte weder die hypothermische noch die Anti-Pentylentetrazolwirkung von Diazepam zeitlich mit dem biochemischen Effekt korreliert werden. Nach CONSOLO, GARATTINI und LADINSKY (1975) verhinderte das Pentylentetrazol nicht die Wirkung des Diazepam auf das Acetylcholin im Hippocampus, aber es machte die Diazepamwirkung auf das striäre Acetylcholin und auf die Muskelerschlaffung wieder rückgängig.

Die Interaktion von Pentylentetrazol und Benzodiazepinen auf Krämpfe, Muskelerschlaffung, Krampfverhalten und striäres Acetylcholin weist auf eine Beziehung zwischen den Wirkungsmechanismen und/oder Wirkorten dieser beiden Substanzen hin.

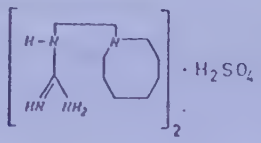
SUPERSTINE und SULMAN veröffentlichten 1966 eine Arbeit, in der sie die endocrinen Wirkungen von Chlordiazepoxid, Diazepam und Guanethidin auf die glandotropen Hormone untersuchten.



Chlordiazepoxid



Diazepam



Guanethidin

Diazepam wurde dabei in einer Dosierung von 5 und 10 mg (= 500 und 1000 µg) pro kg KG und Tag subkutan verabreicht. Die genannten Dosen sind beide größer als 1/10 der LD 50. Als Versuchstiere dienten männliche und weibliche Albinoratten des Sabrastammes der Hebrew-Universität. Diesen Tieren wurde vom 20 ten bis zu ihrem 120 ten Lebenstag täglich die genannten Substanzen verabreicht. Ein bis sechs Tage später wurden diese Ratten getötet.

Als Hinweis für eine FSH-Wirkung diente bei den weiblichen Tieren die histologische Untersuchung von Uterus und Ovarien, bei männlichen Ratten das Gewicht und die histologische Untersuchung der Testes.

Die LH-Wirkung wurde bei den Weibchen durch Zählen der Corpora lutea und Wiegen der Ovarien nachgewiesen. Das Gewicht von Prostata und Samenblasen war bei den Männchen Ausdruck der LH-Wirkung. SUPERSTINE und SULMAN (1966) konnten zeigen, daß unter der Wirkung von Chlordiazepoxid und Diazepam sich das Gewicht der Testes und Ovarien nicht signifikant veränderte. Nur Guanethidin führte in einer Dosierung von 50 mg pro kg KG und Tag eindeutig zu einer Gewichtsabnahme beider Organe. Auf eine Unterdrückung von FSH und LH wies auch die abnehmende Spermatogenese und die Unterdrückung der Leydigzellen hin. Das Gewicht der Rattenovarien war unter der Guanethidinverabreichung signifikant verringert; histologisch lag eine Verringerung reifer Follikel und Gelbkörper vor. Die unterdrückende Wirkung des Guanethidin wurde bei allen Dosierungen sichtbar, wobei die Wirkung auf das Peniswachstum auf die Unterdrückung des LH, die auf den Uterus mehr auf eine Unterdrückung des FSH hinwies. Das Gewicht der Samenblasen und der Prostata wurde durch alle drei Substanzen unterdrückt. Dies deutete auf eine kombinierte Unterdrückung von STH und LH hin. Alle drei Verbindungen, besonders Guanethidin, verzögerten den Descensus testis. Die Ergebnisse ließen somit eine leichte Unterdrückung von LH und FSH vermuten.

SUPERSTINE und SULMAN (1966) zogen aus ihren Versuchsergebnissen den Schluß, daß Chlordiazepoxid und Diazepam den Hypothala-

mus nur sekundär unterdrücken, möglicherweise über die Formatio reticularis. Die Entscheidung, ob die Gonadotropin- und Somatotropin unterdrückende Wirkung von Guanethidin über den Hypothalamus oder über die Hypophyse vermittelt werden, konnte durch Hypothalamus-Hypophysenkulturen herbeigeführt werden. Nach BEN-DAVID, DIK-STEIN und SULMAN (1964) weist jene Methode auf den Hypothalamus als Hauptangriffspunkt hin.

In der vorliegenden Arbeit wird ebenfalls der Versuch unternommen die Wirkung von Diazepam auf die LH- und FSH-Ausschüttung aus dem Hypophysenvorderlappen zu untersuchen. Die biologischen Tests nach STEELMAN und POHLEY (1953) für FSH und nach PARLOW für LH sagen etwas über die biologischen Wirkungen derjenigen LH- und FSH-Aktivitäten aus, die im Radioimmunoassay ermittelt wurden. Unsere Versuchsanordnung zeigt folgende Unterschiede gegenüber derjenigen von SUPERSTINE und SULMAN:

- Statt Albinoratten des Sabra-Stammes der Hebrew-Universität verwendeten wir ausschließlich weibliche Wistarratten des Inzuchtstammes WU.
- Die Wistarratten wurden ovariektomiert und mit Steroiden blockiert um die endogenen Releasingfaktoren des Hypothalamus zu hemmen.
- Statt den Versuchstieren Diazepam vom 20 ten bis zum 120 ten Lebenstag in einer täglichen Dosierung von 500 und 1000 µg pro kg KG subkutan zu applizieren, verabreichten wir Diazepam nur ein einziges Mal in Dosen zwischen 7,8 und 500 µg pro Tier.
- Zur Beurteilung des FSH- und LH-Release dienen in dieser Arbeit nicht primär biologische Parameter, sondern die radioimmunologisch nach der Doppelantikörpermethode bestimmten FSH- und LH-Konzentrationen.

Bei LH zeigt die Dosisabhängigkeit im Radioimmunoassay, daß sowohl 60 als auch 150 Minuten nach der Diazepamverabreichung bei allen angewendeten Dosen die LH-Serumwerte unter, und die Hypo-

physenwerte über den Kontrollwerten liegen. Die niedrigste LH-Serumkonzentration findet sich 60 Minuten p.i. bei der höchsten Dosis (500 µg, siehe Abb. 1), 150 Minuten p.i. bei einer mittleren Dosis (125 µg, siehe Abb. 4). Den größten LH-Gehalt der Hypophysen kann man nach 60 und 150 Minuten bei Verabreichung einer mittleren Dosis beobachten (125 µg, siehe Abb. 2 und 5). 150 Minuten nach intravenöser Verabreichung von 125 µg Diazepam ist der Serum-LH-Spiegel am niedrigsten und die hypophysäre LH-Konzentration am höchsten. Vermutlich kommt es unter Diazepam-Anwendung zu einer Hemmung der LH-Ausschüttung aus der Hypophyse.

Was die zeitliche Abhängigkeit anlangt, so ist die LH-Aktivität im Plasma bis 420 Minuten nach Verabreichung von 250 µg Diazepam gegenüber der Kontrollgruppe erniedrigt (Abb. 7), der hypophysäre LH-Gehalt der Dosisgruppen etwas erhöht (Abb. 8). Die zeitlichen Schwankungen sind unregelmäßig. Dennoch läßt sich ab 150 Minuten p.i. ein spiegelbildliches Verhalten der Serum-LH- und der hypophysären LH-Konzentrationen feststellen.

Wird die Diazepamdosis verringert (31,25 µg, s. Abb. 10), liegen die mittleren LH-Serumwerte nur noch bis 180 Minuten post injectionem signifikant unter der Kontrolle, bzw. die LH-Hypophysenwerte über der Kontrolle. Ab 210 Minuten liegen sowohl die Serum- als auch die Hypophysenwerte im Kontrollbereich.

Vergleicht man die LH-Kinetik nach i.v. Verabreichung von 250 µg Diazepam mit derjenigen nach Gabe von 31,25 µg Diazepam, so kann man feststellen, daß die Hemmung der LH-Ausschüttung aus der Hypophyse nach Applikation einer geringeren Dosis weniger lang andauert.

Bei unseren Experimenten wurde Diazepam auch in seiner Interaktion mit LH-RH untersucht. Die LH-Aktivitäten wurden bei dieser Versuchsreihe ausschließlich immunologisch bestimmt.

Nach intravenöser Injektion von 0,01 µg LH-RH kann man feststellen, daß die mittleren LH-Serumkonzentrationen bis 30 Minuten post in-

jectionem signifikant über der Kontrolle liegen, mit einem Maximum nach 15 Minuten (s. Abb. 25). Wird gleichzeitig mit LH-RH auch Diazepam verabreicht, so sind die mittleren LH-Serumkonzentrationen gegenüber der ausschließlichen LH-RH-Applikation größer und bis 60 Minuten p.i. signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht; das Maximum liegt hier bei 10 Minuten p.i.

Diese Beobachtung legt den Verdacht nahe, daß Diazepam mit dem Releasingfaktor am Hypophysenvorderlappen interferiert. Diese Interaktion könnte in einer Verstärkung der Releasingfaktorwirkung bestehen. 10 Minuten nach Gabe von 0,01 µg LH-RH und 250 µg Diazepam entspricht dem höchsten LH-Serumspiegel die niedrigste hypophysäre LH-Konzentration. Obwohl 80 Minuten später die LH-Serumkonzentrationen wieder im Kontrollbereich liegen, bleiben die LH-Spiegel der Hypophysen weiterhin gegenüber der Kontrolle signifikant erniedrigt.

Bei FSH zeigt die Dosisabhängigkeit im Radioimmunoassay, daß 60 Minuten nach der Diazepamverabreichung die meisten - und 150 Minuten p.i. alle FSH-Serumkonzentrationen unterhalb der mittleren Kontrolle liegen.

Wie aus den Abbildungen 13 und 16 zu erkennen, verursacht die höchste Dosis (500 µg) die stärkste Abweichung von der Kontrolle. Den gegenüber der Kontrolle erniedrigten FSH-Serumkonzentrationen stehen 60 Minuten p.i. keine - wohl aber 150 Minuten p.i. erhöhte Hypophysenwerte gegenüber.

Die Ergebnisse aus den biologischen Tests widersprechen teilweise dem eben gesagten. Die FSH-Serumkonzentrationen sind 150 Minuten p.i. bei allen Dosierungen signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht (Tab. 18, Abb. 18).

Die Kinetik zeigt, daß die FSH-Aktivität im Serum bis 420 Minuten nach der Verabreichung von 250 µg Diazepam nicht wesentlich von derjenigen der Kontrollgruppe verschieden ist. Teilweise sind die Werte

jedoch signifikant erniedrigt. Im biologischen Test ergibt sich zuweilen eine signifikante Erhöhung. Die zeitlichen Schwankungen sind unregelmäßig. Bei verringerter Diazepamdosis (s. Abb. 22 und 23) liegen die mittleren FSH-Serumwerte bis 300 Minuten unter - nach 300 Minuten über der Kontrolle.

Der mittlere hypophysäre FSH-Gehalt der Dosisgruppen ist bei fast allen Zeiten größer als derjenige der Kontrollgruppe.

Nach intravenöser Injektion von 0,01 µg LH-RH läßt sich feststellen, daß die mittleren FSH-Serumkonzentrationen generell über der Kontrolle liegen, mit einem Maximum nach 60 Minuten (Abb. 28). Wird gleichzeitig mit LH-RH auch Diazepam verabreicht, so sind die mittleren FSH-Serumkonzentrationen gegenüber der ausschließlichen LH-RH-Applikation etwas größer, aber nicht signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Das Maximum liegt auch hier bei 60 Minuten p.i. Diese Beobachtung paßt zu den Ergebnissen, daß bei gleichzeitiger Gabe von LH-RH und Diazepam eine stärkere LH-Ausschüttung stattfindet.

Die mittleren hypophysären FSH-Konzentrationen liegen nach Gabe von 0,01 µg LH-RH und 250 µg Diazepam mehrheitlich unter der mittleren Kontrolle. Ein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle besteht jedoch nicht.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen also im wesentlichen Folgendes erkennen:

Nach 60 Minuten ist bei mittleren Dosen der LH-Gehalt der Hypophysen am höchsten, während der hypophysäre FSH-Gehalt zu diesem Zeitpunkt noch im Kontrollbereich liegt. Nach 150 Minuten ist bei Anwendung mittlerer Dosen Diazepam der LH- und FSH-Gehalt gegenüber der Kontrolle erhöht. Sowohl nach 60 als auch nach 150 Minuten liegt der LH- bzw. der FSH-Gehalt der Hypophysen bei Verwendung höchster Dosen im Kontrollbereich.

Der LH-Gehalt des Serums ist 150 Minuten p.i. bei Gabe einer mittleren Diazepammenge (125 µg) am niedrigsten, der LH-Hypophysengehalt am höchsten. Nach 60 Minuten kann man die niedrigste LH-Serumkonzentration bei Applikation der höchsten Dosis feststellen. Da das Ergebnis dieses Versuches nur auf vier Serumwerten beruht, ist diesem Wert keine übermäßige Bedeutung beizumessen.

Die Dosisabhängigkeit von Diazepam ist unterschiedlich in Bezug auf LH und FSH. Bei Verwendung einer mittleren Dosis wird der LH-Spiegel im Serum am deutlichsten gesenkt, bzw. in den Hypophysen erhöht, während bei Anwendung der höchsten Dosis der FSH-Spiegel im Serum am stärksten abfällt; der hypophysäre FSH-Gehalt liegt dabei im Kontrollbereich.

Die Hypophysen zeigen nur nach Anwendung mittlerer Dosen einen erhöhten LH- bzw. FSH-Gehalt.

Der zeitliche Verlauf der LH- und FSH-Konzentrationen, sowohl im Serum als auch in den Hypophysen, ließ keine Regelmäßigkeit erkennen. Bei Gabe von 250 µg Diazepam sind die LH-Serumkonzentrationen mehrheitlich signifikant erniedrigt, die LH-Hypophysenwerte dagegen größtenteils erhöht, wenn auch nicht signifikant. Ab 150 Minuten p.i. liegt ein spiegelbildliches Verhalten der LH-Konzentrationen in Seren und Hypophysen vor. Nach Injektion von 31,25 µg Diazepam finden sich 180 Minuten lang signifikant erniedrigte LH-Serumkonzentrationen und erhöhte LH-Hypophysenwerte. Nach 180 Minuten liegen Serum- und Hypophysenkonzentrationen annähernd im Kontrollbereich. Die Anwendung von 250 µg Diazepam bewirkte eine Änderung der FSH-Serum- und Hypophysenkonzentrationen.

Nach Gabe einer mittleren Diazepamdosis (125 µg) sind die hypophysären LH-Werte schon früher erhöht (60 Minuten p.i.) als die hypophysären FSH-Werte.

Bei gleichzeitiger Gabe von Diazepam und LH-RH wird die Releasingfaktorwirkung verstärkt: Die LH-Serumkonzentration erreicht früher

ihr Maximum und bleibt länger erhöht als bei alleiniger Gabe von LH-RH und die LH-Hypophysenspiegel bleiben auch dann gegenüber der Kontrolle signifikant erniedrigt, wenn die Serum-LH-Konzentrationen bereits wieder im Kontrollbereich liegen. Die FSH-Serumkonzentration wird nach LH-RH und Diazepamgabe nur geringfügig erhöht, die hypophysäre FSH-Konzentration mehrheitlich gegenüber der Kontrolle vermindert.

Im Gegensatz zu SUPERSTINE und SULMAN (1966), deren Ergebnisse nur eine insignifikante Unterdrückung der Gonadotropininkretion durch Diazepam ergaben, zeigt die vorliegende Arbeit, daß die LH-Inkretion durch Diazepam zum Teil sogar signifikant gehemmt wird.

F ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wird die Wirkung von Diazepam auf die LH- und FSH-Ausschüttung aus dem Hypophysenvorderlappen untersucht.

Die Releasingaktivität wurde mittels der Methode von RAMIREZ und McCANN (1963) nachgewiesen. Diazepam wurde in physiologischer NaCl-Lösung gelöst und den mit Östrogen-Progesteron blockierten weiblichen Wistarratten intravenös zusammen mit Heparin injiziert. Der LH-Gehalt des Serums wurde biologisch nach der Methode von PARLOW (1958) und radioimmunologisch nach der Doppelantikörpermethode bestimmt. Die Bestimmung des Serum-FSH-Gehaltes erfolgte nach der biologischen Methode von STEELMAN und POHLEY (1953) und im Radioimmunoassay nach der Doppelantikörpermethode. Die Hypophysen wurden nach einer modifizierten Anleitung nach PARLOW (1964) aufgearbeitet. Der Gonadotropingehalt der einzelnen Hypophysen wurde radioimmunologisch festgestellt.

Diazepam führt in den meisten Fällen zu einer signifikanten Verringerung der LH-Serumkonzentrationen. Bei Verabreichung einer mittleren Dosis (125 µg) sind die LH-Serumwerte am niedrigsten und die LH-Hypophysenkonzentrationen am höchsten. Die zeitlichen Schwankungen weisen keine Regelmäßigkeit auf. Es läßt sich jedoch ab 150 Minuten p.i. ein spiegelbildliches Verhalten der gegenüber der Kontrolle erhöhten Serum-LH- und der gegenüber der Kontrolle verminderten hypophysären LH-Konzentrationen feststellen.

Wird Diazepam zusammen mit LH-RH verabreicht, erreicht die Serum-LH-Konzentration früher ein höheres Maximum und bleibt länger erhöht. Zehn Minuten nach Gabe von 0,01 µg LH-RH und 250 µg Diazepam entspricht dem höchsten LH-Serumspiegel die niedrigste hypophysäre LH-Konzentration. Der Hypophysen-LH-Spiegel bleibt auch dann gegenüber der Kontrolle signifikant erniedrigt, wenn die LH-Serumkonzentration wieder im Kontrollbereich liegt.

Die FSH-Serumkonzentrationen nehmen gegenüber der Kontrolle teilweise ab. Bei Anwendung der höchsten Dosis (500 µg Diazepam) kommt es 60 und 150 Minuten p.i. zur stärksten Verringerung der FSH-Serumkonzentrationen. Den gegenüber der Kontrolle signifikant erniedrigten FSH-Serumkonzentrationen stehen 60 Minuten p.i. keine - wohl aber 150 Minuten p.i. nicht signifikant erhöhte FSH-Hypophysenspiegel gegenüber. Bei einer geringeren Dosis (31,25 µg Diazepam) liegen die mittleren FSH-Serumwerte nur bis 300 Minuten unter, nach 300 Minuten geringfügig über der Kontrolle. Die zeitlichen Schwankungen der FSH-Serumkonzentrationen sind unregelmäßig. Der mittlere hypophysäre FSH-Gehalt der Dosisgruppen ist sowohl nach i.v. Verabreichung von 250 µg als auch von 31,25 µg Diazepam bei fast allen Zeiten größer als derjenige der Kontrollgruppe.

Bei gleichzeitiger Applikation von LH-RH und Diazepam sind die FSH-Konzentrationen im Serum etwas größer als bei alleiniger LH-RH-Gabe, und die hypophysären FSH-Konzentrationen gegenüber der Kontrolle vermindert, wenn auch nicht signifikant wie die hypophysäre LH-Konzentration.

G LITERATURVERZEICHNIS

AKERT, K.:
Das limbische System und seine funktionelle Bedeutung.
Fortschr. Geburtsh. Gynäk. 19, 4-17 (1964)

BARRACLOUGH, C.E.:
Modifications in the CNS regulation of reproduction after exposure of prepubertal rats to steroid hormones.
Rec. Prog. in Hor. Res. 22, 503-539 (1966)

BARRACLOUGH, C.E. and GORSKI, R.A.:
Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat.
Endocrinology 68, 68-79 (1961)

BARTHOLINI, G., KELLER, H., PIERI, L. and PLETSCHER, A.:
The effect of diazepam on the turnover of cerebral dopamine.
In: The Benzodiazepines, edited by S. GARATTINI, E. MUSSINI, and L.O. RANDALL.
Raven Press, New York, pp. 235-240 (1973)

BAUMGARTEN, K.:
Spasmolyse, Relaxation und Sedation des menschlichen Uterus;
In: Die Beeinflussung der Uterusmobilität, pp. 119-133.
(Hollinek, Wien 1967)

BELESLIN, D., POLAK, R.L. and SPROULL, D.H.:
The effect of leptazol and strychnine on the acetylcholine release from the cat brain.
Journal of phyiology, 181, 308-316 (1965)

BEN-DAVID, M., DIKSTEIN, S. and SULMAN, F.G.:
Effect of differents steroids on prolactin secretion in pituitary-hypothalamus organ co-culture.
Proc. Soc. exp. Biol. Med., 117, 511-514 (1964)

BINDONI, M. and RAFFAELE, R.:
Mitotic activity in the adenohypophysis of rats after pinealectomy.
J. Endocr. 41, 451-452 (1968)

BLOBEL, R. und SCHLUMBERGER, H.D.:
Über die zentrale Steuerung der weiblichen Gonadenfunktion.
Med. Welt 51, 3132-3141 (1967)

CHENEY, D.L., TRABUCCHI, M., HANIN, I. and COSTA, E.:
Effect of several benzodiazepines on concentrations and specific activities of choline and acetylcholine in mouse brain.
Pharmacologist 15, 162 (1973)

CHOWERS, J. and McCANN, S.M.:
Content of luteinizing hormone-releasing factor and luteinizing hormone during the estrous cycle and after changes in gonadal steroid titers.
Endocrinology 76, 700-708 (1965)

CONSOLO, S., FANELLI, R., GARATTINI, S., GHEZZI, D., JORI, A., LADINSKY, H., MARC, V. and SAMANIN, R.:
Dopaminergic-cholinergic interaction in the striatum: Studies with piribedil.
In: Advances in Neurology, Vol. 9, 257-272, Raven Press, New York (1975)

CONSOLO, S., LADINSKY, H. and GARATTINI, S.:
Effect of several dopaminergic drugs and trihexyphenidyl on cholinergic parameters in the rat striatum.
Journal of Pharmacy and Pharmacology, 26, 275-277 (1974)

CONSOLO, S., GARATTINI, S. and LADINSKY, H.:
Action of the benzodiazepines on the cholinergic system.
Raven Press, New York 63-80 (1975)

CONSOLO, S., LADINSKY, H., PERI, G. and GARATTINI, S.:
Effect of central stimulants and depressants on mouse brain acetylcholine and choline levels.
European Journal of Pharmacology, 18, 251-255 (1972)

CONSOLO, S., LADINSKY, H., PERI, G. and GARATTINI, S.:
Effect of diazepam on whole brain area acetylcholine and choline levels.
European Journal of Pharmacology, 27, 266-268 (1974 b)

COPER, H.:
Psychopharmaka, Pharmakotherapie von Psychosen und psychoreaktiven Störungen.
In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, herausgegeben von W. FORTH, HENSCHLER, D. und RUMMEL, W.,
Bibliographisches Institut AG Zürich, pp. 433-450 (1975)

CORBIN, A.:
Pituitary and plasma LH of ovariectomized rats with median eminence implants of LH.
Endocrinology 78, 893-896 (1966)

CORBIN, A. and COHEN, A.I.:
Effect of median eminence implants of LH on pituitary LH of female rats.
Endocrinology 78, 41-46 (1966)

CRAMER, O.H. and PORTER, J.C.:
In: Drug effects on neuro-endocrine regulation.
Elsevier, New York, Vol. 39, 73-85 (1973)

DAVID, M.A., FRASCHINI, F. and MARTINI, L.:
Control of LH secretion: role of a 'short' feedback mechanism.
Endocrinology 78, 55-60 (1966)

DESCLIN, L., FLAMENT-DURAND, J. and GEPTS, W.:
Transplantation of the ovary to the spleen in rats with persistent estrus resulting from hypothalamic lesions.
Endocrinology 70, 429-436 (1962)

DE SILVA, J.A.F., SCHWARTZ, M.A., STEFANOVIC, V., KAPLAN, J., D'ARCONTE, L.:
Determination of diazepam (Valium) in blood by gas-liquid chromatography.
Analyt. Chem. 36, 2099-2105 (1964)

DHARIWAL, A.P.S., ANTUNES-RODRIGUES, J. and McCANN, S.M.:
Purification of ovine luteinizing hormone releasing factor by gel filtration and ion exchange chromatography.
Proc. Soc. Exp. Biol. med. 118, 999-1003 (1965)

DÖCKE, F. and DÖRNER, G.:
The mechanism of the induction of ovulation by oestrogens.
J. Endocrin. 33, 491-499 (1965)

DONOSO, A.O. and DE GUTIERREZ MOYANO, M.B.:
Adrenergic activity in hypothalamus and ovulation.
Proc. Soc. Exp. Biol. med. 135, 633-635 (1970)

DORFMAN, R.J. and DORFMAN, A.S.:
Pituitary gonadotropic inhibitory action of estrone in parabiotic rats.
Endocrinology 72, 115-116 (1963)

DOTEUCHI, M. and COSTA, E.:
Pentylenetetrazol convulsions and brain catecholamine turnover rate in rats and mice receiving diphenylhydantoine or benzodiazepines.
Neuropharmacology, 12, 1059-1072 (1973)

ELEFTHERIOU, B.E., DESJARDINS, C. and ZOLOVICK, A.J.:
Effects of amygdaloid lesions on hypothalamic hypophysical luteinizing hormone activity.
J. Reprod. Fertil. 21, 249-254 (1970)

ELWERS, M. and CRITCHLOW, V.:
Precocious ovarian stimulation following hypothalamic and amygdaloid lesions in rats.
Amer. J. Physiol. 198, 381-385 (1960)

ESSMAN, W.:
Subcellular actions of benzodiazepines.
In: The benzodiazepines, edited by GARATTINI, E., MUSSINI, E. and RANDALL, L.O.
Raven Press, New York, pp. 177-190 (1973)

EVERETT, J.W.:
Ovulation in rats from preoptic stimulation through platinum electrodes. Importance of duration and spread of stimulus.
Endocrinology 76, 1195-1201 (1965)

EVERETT, J.W. and QUINN, D.L.:
Differential hypothalamic mechanism inciting ovulation and pseudopregnancy in the rat.
Endocrinology 78, 141-150 (1966)

FAWCETT, C.P., REED, M., CHARLTON, H.M. and HARRIS, G.W.:
The purification of luteinizing hormone-releasing factor with some observations on its properties.
Biochem. J. 106, 229-236 (1968)

FLAMENT-DURAND, J. and DESCLIN, L.:
Observations concerning the hypothalamic control of pituitary lutetrophin secretion in the rat.
Endocrinology 75, 22-26 (1964)

FLERKO, B.:
Einfluß experimenteller Hypothalamusläsion auf die durch Follikelhormon indirekt hervorgerufene Hemmung der Luteinisation.
Endokrinologie 34, 202-208 (1957)

FLERKO, B. and BARDOS, V.:
Absence of compensatory ovarian hypertrophy in rats with anterior hypothalamic lesions.
Acta. endocrin. Kbh. 36, 180-184 (1961)

FRASCHINI, F., MESS, B. and MARTINI, L.:
Pineal gland, melatonin and the control of luteinizing hormone secretion.
Endocrinology 82, 919-924 (1968 b)

FRASCHINI, F., MOTTA, M. and MARTINI, L.:
A short feedback mechanism controlling FSH secretion.
Experientia 24, 270-271 (1968 a)

FUXE, K. and HÖKFELT, T.:
Catecholamines in the hypothalamus and the pituitary gland.
Frontiers in Neuroendocrinology, Oxford University Press 289, 47-96 (1969)

GARATTINI, S., MUSSINI, E., MARCUCCI, F. and GUAITANI, A.:
Metabolic studies on benzodiazepines in various animal species.
In: The benzodiazepines, edited by GARATTINI, S., MUSSINI, E. and RANDALL, O.O.,
Raven Press, New York, pp. 75-97 (1973 a)

GARATTINI, S., MUSSINI, E., RANDALL, L.O. (Ed.):
The benzodiazepines.
New York: Raven Press, 1973 b

GARDNER, C.R. and WEBSTER, R.A.:
The effect of some anticonvulsant drugs on leptazol and bicuculline induced acetylcholine efflux from rat cerebral cortex.
British Journal of Pharmacology, 47, 652 P (1973)

GATTI, G.L., BONAVOGLIA, F. and MICHALEK, H.:
Brain acetylcholine levels in diazepam attenuation of DFP toxicity in mice.
Abstracts, 4th International Society for Neurochemistry, Tokyo, August, p 26-31, p. 492 (1973)

GIARMAN, N.J. and PEPEU, G.:
Drug-induced changes in brain acetylcholine.
British Journal of Pharmacology, 19, 226-234 (1962)

GLOOR, P.:
Telencephalic influences upon the hypothalamus.
In: Hypothalamic-hypophysial interrelationships, pp. 74-113. Eds. FIELD, W.S., GUILLEMIN, R. and CARTON, C.A., Springfield, III.: Charles C. Thomas (1956)

GREEN, J.D. and HARRIS, G.W.:
The neurovascular link between the neurohypophysis and the adenohypophysis.
J. Endocr. 5, 136-146 (1947)

GREEN, V.A.:
Alterations in the activity of pentothal, phenobarbital, pentylenetetrazol, and strychnine by cholinesterase inhibitors.
Journal of Pharmaceutical Sciences, 53, 762-766 (1964)

GROOM, G.V. and BOYNS, A.R.:
Effect of hypothalamic releasing factors by organ and steroids on release of gonadotrophins by organ cultures of human foetal pituitaries.
J. Endocrinol., 59, 511-522 (1973)

GROOM, G.V. and COOKE, I.D. and BOYNS, A.R.:
Differential release of individual gonadotrophins by the human foetal pituitary gland after stimulation by cyclic AMP and sodium fluoride.
J. Endocrinol., 50, 709-710 (1971)

GUYENET, P., AGID, Y., JAVOY, F., BEAUJOUAN, J.-C. and GLOWINSKI, J.:
Action selective des neuroleptiques sur les neurones cholinergiques du neostriatum chez le rat: Antagonisme vis-à-vis de l'apomorphine.
Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'academie des sciences. 278, 2679-2682 (1974)

HALASZ, B.:
The endocrine effects of isolation of the hypothalamus from the rest of the brain.
Frontiers in Neuroendocrinology, 289, 307-342 (1969)

HARRIS, G.W.:
Hypothalamic control of the anterior pituitary gland.
Ciba found. Coll. Endocrinology, vol. 4 p. 106 (1952)

HEIMER, L und NAUTA, W.J.H.:
The hypothalamic distribution of the stria terminalis in the rat.
Brain research 13, 284-297 (1969)

HELLER, S. and SCHLUMBERGER, H.D.:
Comparison of the gonadotropin-release induced by a hypothalamic factor and by a synthetic decapeptide exhibiting LH-releasing activity.
Gynec. Invest. 2, 122-127 (1971)

HELLER, S.:
Nachweis und biologische Charakterisierung von menschlichen Gonadotropin-Releasing-Aktivitäten.
Fortschr. Geb. Gynäk. 46, 146-214 (1972)

HEMSWORTH, B.A. and NEAL, M.J.:
The effect of central stimulant drugs on acetylcholine release from rat cerebral cortex.
British Journal of Pharmacology 34, 543-550 (1968)

HIROI, M., SUGITA, S. and SUZUKI, M.:
Ovulation induced by implantation of cupric sulfate into the brain of the rabbit.
Endocrinology 77, 963-967 (1965)

HOHLWEG, H. und JUNKMANN, K.:
Die hormonal-nervöse Regulierung der Funktion des Hypophysenvorderlappens.
Klin. Wschr. 11, 321-323 (1932)

IDÄNPÄÄN-HEIKKILÄ, J.E., TASKA, R.J., ALLEN, A.H. and SCHOOLAR, J.C.:
Autoradiographic study of the fate of Diazepam-C (14) in the monkey brain.
Arch. int. Pharmacodyn. 194, 68-77 (1971)

IGARASHI, M., NALLAR, R. and McCANN, S.M.:
Further studies on the follicle-stimulating hormone-releasing action of hypothalamic extracts.
Endocrinology 75, 901-907 (1964)

JOHNSON, D.D. and LOWNDES, H.E.:
Reduction by diazepam of repetitive electrical activity and toxicity resulting from soman.
European Journal of Pharmacology 28, 245-250 (1974)

JOMMI, G., MANITTO, P. and SILANOS, M.A.:
Metabolism of diazepam in rabbits.
Arch. biochem. 108, 334-340 (1964)

JOMMI, G., MANITTO, P. and SULANOS, M.A.:
Metabolism of diazepam in rabbits.
Arch. biochem. 108, 562-568 (1964)

JUSTISZ, M., PALOMA DE LA LLOSA, M.:
L-adenosine-3-5-monophosphate cyclique, un intermediaire probable de l'action de l'hormone hypothalamique FRF.
C.R. Acad. sci. (D) 268, 19 1636-1639 (1969)

KAKRA, P.S., KALRA, S.P., KRULICH, L., FAWCETT, C.P. and McCANN, S.M.:
Involvement of norepinephrine in transmission of the stimulatory influence of progesterone on gonadotropin release.
Endocrinology 90, 1168-1176 (1972)

KALRA, P.S. and McCANN, S.M.:
Involvement of catecholamines in feedback mechanisms.
Progress in Brain Research 39, 185-198 (1973)

KALRA, S.P. and McCANN, S.M.:
Effect of drugs modifying catecholamine synthesis on LH release induced by preoptic stimulation in the rat.
Endocrinology 93, 356-362 (1973)

KAMBERI, I.A., MICAL, R.S. and PORTER, I.C.:
Luteinizing hormone releasing activity in hypophysial stalk blood and elevation by dopamine.
Science 166, 388-390 (1969)

KAMBERI, I.A., MICAL, R.S. and PORTER, J.C.:
Intraventricular (V_3) injection or pituitary perfusion of catecholamines and prolactin (LTH) release.
Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 29, 378 (1970)

KAMBERI, I.A., MICAL, R.S. and PORTER, J.C.:
Effect of anterior pituitary perfusion and intraventricular injection of catecholamines on FSH release.
Endocrinology 88, 1003-1011 (1971)

KAMBERI, I.A., SCHNEIDER, H.P.G. and McCANN, S.M.:
Action of dopamine to induce release of FSH-releasing-factor (FRF) from hypothalamic tissue in vitro.
Endocrinology 86, 278-284 (1970)

KAMM, G., KELM, R.:
Quantitativer Nachweis von 7-Chlor-1,3-dihydro-3hydroxy-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepinon im Plasma bei einmaliger und längerer Verabreichung.
Arzneimittelforsch. 19, 1659-1662 (1969)

KANEMATSU, S. and SAWYER, C.H.:
Effects of hypothalamic and hypophyseal estrogen implants on pituitary and plasma LH in ovariectomized rabbits.
Endocrinology 75, 579-585 (1964)

KATO, J. and VILLEE, C.A.:
Factor affecting uptake of estradiol-6,7-^{3}H by the hypophysis and hypothalamus.
Endocrinology 80, 1133-1138 (1967)

KINCL, F.A., RINGOLD, H.J. and DORFMAN, R.J.:
Pituitary gonadotropin inhibition by s.c. administered steroids.
Acta endocrin., Kbh. 36, 83-86 (1961)

KLÜVER, H., BUCY, P.C.:
Preliminary analysis of functions of the temporal lobe in monkeys.
Arch. Neurol. Psychiat. (USA) 42, 979 (1939)

LADINSKY, H., CONSOLO, S., PERI, G. and GARATTINI, S.:
Increase in mouse and rat brain acetylcholine levels by diazepam.
In: The benzodiazepines, edited by GARATTINI, S., MUSSINI, E. and RANDALL, L.O.,
Raven Press, New York, pp. 241-242 (1973)

LIPP, J.A.:
Effect of benzodiazepinederivatives on soman-induced seizure activity and convulsions in the monkey.
Archives Internationales de Pharmacodynamic et de Therapie 202, 244-251 (1973)

LONGONI, R., MULAS, A. and PEPEU, G.:
Drug effect on acetylcholine level in discrete brain regions of rats killed by microwave irradiation.
British Journal of Pharmacology 52, 429-430 P. (1974)

MAC LEAN, P.D.:

Some psychiatric implications of physiological studies on frontotemporal potion of limbic system (visceral brain). Electroenceph. clin. Neurophysiol. (Kanada) 4, 407-418 (1952)

MAC LEOD, R.M.:

Influence of norepinephrine and catecholamine-depleting agents on the synthesis and release of prolactin and growth hormone.
Endocrinology 85, 916-923 (1969)

MAHNERT, A.:

Hypophysenvorderlappen und Ovarium. Tierexperimentelle Untersuchungen über das Bestehen wechselseitiger Beziehungen zwischen Ovarium und dem Hypophysenvorderlappen.
Zbl. Gynäk. 52, 1754 (1928)

MALVEN, P.V.:

Electrical stimulation of the median eminence in ovariectomized and estradiol-treated sheep. Increased LH-release and evidence for neural regulation in of spontaneous LH rhythmus..
Neuroendocrinology 19, 81-90 (1975)

MAO, C.C., GUIDOTTI, A. and COSTA, E.:

Inhibition by diazepam on the tremor and the increase of cerebellar cAMP content elicited by harmaline.
Brain research 83, 516-519 (1975)

MARCUCCI, F., FANELLI, R., MUSSINI, E. and GARATTINI, S.:
Further studies on species difference in diazepam metabolism.
European Journal of Pharmacology 9, 253-256 (1970)

MARCUCCI, F., GUAITANI, A., FANELLI, R., MUSSINI, E. and GARATTINI, S.:
Metabolism and anticonvulsant activity of diazepam in guinea pigs.
Biochemical Pharmacology 20, 1711-1713 (1971)

MARCUCCI, F., MUSSINI, E., GUAITANI, A., FANELLI, R., GARATTINI, S.:
Anticonvulsant activity and brain levels of diazepam and its metabolites in mice.
Europ. J. Pharmacol. 16, 311-314 (1971)

MARSELLI, P.L., CASSANO, G.B., PLACIDI, G.F., MUSCETTOLA, G.B., RIZZO, M.:
Kinetics of the distribution of ^{14}C-diazepam and its metabolites in various areas of cat brain;
In: The benzodiazepines, pp. 129-143, Ed. GARATTINI, S., MUSSINI, E., RANDALL, L.O.
New York: Raven Press (1973)

MARTINI, L., FRASCHINI, F. and MOTTA, M.:
Neural control of anterior pituitary functions.
Recent Progr. Hormone Res. 24, 439-496 (1968)

MARTINI, L., FRASCHINI, F. and MOTTA, M.:
Hypothalamic mechanism and anterior pituitary functions; in Advances in the biosciences. 1. Schering Symp. Endocrinology, Berlin 1967, p. 201 (Pergamon Press, London 1969)

McCANN, S.M. and RAMIREZ, V.D.:
The neuroendocrine regulation of hypophyseal luteinizing hormone secretion.
Recent Progr. Hormone Res. 20, 131-181 (1964)

McCANN, S.M.:
A hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor.
Amer. J. Physiol. 202, 395-400 (1962)

McCANN, S.M., OJEDA, S.R., FAWCETT, C.P., KRULICH, L.:
Catecholaminergic control of gondatropin and prolactin secretion with particular reference to the possible participation of dopamine.
Adv. Neurol. 5, 435-445 (1974)

MICHAEL, R.P.:
Estrogen sensitive neurons and sexual behaviour in female cats.
Science 136, 322-323 (1962)

MITCHELL, J.F.:
The spontaneous and evoked release of acetylcholine from the cerebral cortex.
Journal of physiology 165, 98-116 (1963)

NAUTA, W.J.H.:
An experimental study of the fornix system of the rat.
J. comp. Neurol. 104, 247-273 (1956)

NIKITOWITCH-WINER, M.B. and EVERETT, J.W.:
Comparative study of luteotropin secretion by hypophyseal autotransplantants in the rat. Effects of site and stages of the estrus cycle.
Endocrinology 62, 522-532 (1958)

OJEDA, S.R., KRULICH, L. and McCANN, S.M.:
Evidence for participation of a catecholaminergic mechanism in the post-castration rise in plasma gonadotropins.
Neuroendocrinology 12, 295-315 (1973)

PAESI, F.J.A. and REES, G.P. VAN:
The effect of gonadectomy on the response of the pituitary ICSH-content to steroid sex hormones.
Acta endocrin., Kbh. 35, 235-244 (1960)

PARLOW, A.F.:
A rapid bioassay for LH and factors stimulating LH-secretion.
Fed. Proc. 17, 402 (1958)

PARLOW, A.F.:
Importance of differential quantitative bioassay for pituitary gonadotrophins in the rat.
Endocrinology 75, 138-139 (1964)

PASCHKIS, K.E. and RAKAFF, A.E.:
Some aspects of the physiology of estrogenic hormones.
Recent Progr. Hormone Res. 5, 115-149 (1950)

PAVEL, S. and PETRESCU, S.:
Inhibition of gonadotrophin by a highly purified pineal peptide and by synthetic arginine vasotocin.
Nature. Lond. 212, 1054 p (1966)

PELZER, H. und MAASS, D.:
Pharmakokinetik und Metabolismus von 7-Chlor-1,3-dihydro-3-hydroxy-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2on und dessen Hemisuccinat beim Menschen.
Arzneimittel-Forsch. 10, 1652-1656 (1969)

POLC, P., MÖHLER, H. and HAEFELY, W.:
The effect of diazepam on spinal cord activities: possible sites and mechanisms of action.
Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmakology 284, 319-337

POPA, G.T. and FIELDING, U.:
A portal circulation from the pituitary to the hypothalamic region.
J. of Anat. 65, 88 (1931)

PÖLDINGER, W.:
Kompendium der Psychopharmakatherapie.
Deutsche Hoffmann-La-Roche A.G. Grenzach (1967)

RAISMAN, G., COWAN, W.M. and POWELL, T.P.S.:
An experimental analysis of the efferent projection of the hippocampus.
Brain 89, 83-108 (1966)

RAMIREZ, V.D., NALLAR, R. and McCANN, S.M.:
Purification of luteinizing hormone-releasing factor from beef hypothalamus.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 115, 1072-1076 (1964 a)

RAMIREZ, V.D. and McCANN, S.M.:
A highly sensitive test for LH-releasing activity: the ovariectomized, estrogen-progesteron-blocked rat.
Endocrinology 73, 193-198 (1963 a)

RANDALL, L.O., SCHECKEL, C.L., BANZINGER, R.F.:
Pharmacology of the metabolites of chlordiazepoxide and diazepam.
Curr. ther. Res. 590-606 (1965)

ROBINSON, G.A., BUTCHER, R.W. and SUTHERLAND, G.W.:
Cyclic AMP.
A. Rev. Biochem. 37, 149-174 (1968)

SAWYER, C.H., EVERETT, J.W. and MARKEE, J.E.:
A neutral factor in the mechanism by which estrogen induces the release of luteinizing hormone in the rat.
Endocrinology 44, 218 (1949)

SCHAALEK, W., SCHLOSSER, W. and RANDALL, L.O.:
Recent developments in the pharmacology of the benzodiazepines.
Advances in Pharmacology and Chemotherapy 10, 119-183 (1972)

SCHALLEK, W., ZABRANSKY, F. and KUEHN, A.:
Effects of benzodiazepines on central nervous system of cat.
Archives internationales de Pharmacodynamie et de Therapie 149, 467-483 (1964)

SCHALLY, A.V., SAITO, T., ARIMURA, A., MÜLLER, E.E., BOWERS, C.Y. and WHITE, W.F.:
Purification of follicle-stimulating hormone-releasing factor (FSH-RF) from bovine hypothalamus.
Endocrinology 79, 1078 (1966)

SCHALLY, A.V., ARIMURA, A., KASTIN, A.j., MATSUO, H., BABA, Y., REDDING, T.W., NAIR, R.M.G. and DEBELJUK, L.:
Gonadotrophin-releasing-hormone: One polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle stimulating hormones.
Science, N.Y. 173, 1036-1037 (1971 a)

SCHALLY, A.V., BABA, Y., REDDING, T.W., MATSUO, H. and ARIMURA, A.:
Further studies on the enzymatic and chemical inactivation of hypothalamic FSH-RH.
Neuroendocrinology 8, 347-358 (1971)

SCHALLY, A.V., NAIR, R.M.G., REDDING, T.W. and ARIMURA, A.:
Isolation of the luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone releasing hormone from porcine hypothalami.
J. biol. Chem. 246, 7230-7236 (1971 b)

SCHALLY, A.V., REDDING, T.W., MATSUO, H. and ARIMURA, A.:
Stimulation of FSH- and LH-release in vitro by natural and synthetic LH and FSH releasing hormone.
Endocrinology 90, 1561-1568 (1972)

SCHNEIDER, H.P.G. and McCANN, S.M.:
Mono- and indolamines and control of LH secretion.
Endocrinology 86, 1127 (1970)

SCHNEIDER, H.P.G. and McCANN, S.M.:
Release of LH-releasing factor (LRF) into the peripheral circulation of hypophysectomized rats by dopamine and its blockade by estradiol.
Endocrinology 78, 249-253 (1970)

SCHWARTZ, M.A., KOECHLIN, B.A., KROL, G.:
Metabolism of diazepam in rat, dog and man.
Fed. Proc. 22/1, 367 (1963)

SCHWARTZ, M.A., KOECHLIN, B.A., POSTMA, E., PALMER, S., KROL, G.:
Metabolism of diazepam in rat, dog and man.
J. Pharmacol. exp. Ther. 149, 423-435 (1965)

SETHY, V.H. and VAN WOERT, M.H.:
Modification of striatal acetylcholine concentration by dopamine receptor agonists and antagonists.
Research communications in chemical pathology and pharmacology 8, 13-28 (1974)

SOFFER, L.J., FOGEL, M. and RUDAVSKY, A.Z.:
The presence of a gonadotrophin-inhibiting substance in pineal gland extracts.
Acta endocrin., Kbh. 48, 561-564 (1965)

STEELMAN, S.L. and POHLEY, F.M.:
Assay of the follicle-stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotrophin.
Endocrinology 53, 604-616 (1953)

STEIDINGER, J., SCHMID, E.:
Untersuchungen über den Stoffwechsel von 7-Chlor-1,3-dihydro-3-hydroxy-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on.
Arzneimittel-Forsch. 20, 1232-1235 (1970)

STOCK, A.J.:
Untersuchungen über die Wirkung eines Benzodiazepinderivates Flunitrazepam auf die Freisetzung von Follikel stimulierendem und luteinisierendem Hormon aus der Hypophyse.
Inaugural-Dissertation, Universität Tübingen 1978

SUPERSTINE, E. und SULMAN, F.G.:
The mechanism of the push and pull principle / VII Endocrine effects of chlordiazepoxide, diazepam and guanethidine.
Arch. int. Pharmacodyn. 160, No 1, 133-146 (1966)

SZENTAGOTHAI, J., FLERKO, B., MESS, B., HALASZ, B.:
Hypothalamic control of the anterior pituitary.
(Akademiai Kiadó, Budapest 1968)

TANG, L.K. and SPIES, H.G.:
Effect of synthetic LH-releasing factor (LRF) on LH-secretion in monolayer cultures of the anterior pituitary cells of cynomologus monkeys.
Endocrinology 25, 1016-1021 (1974)

TAUBERT, A.D.:
Gynäkologische Endokrinologie
in: Schmidt-Matthiesen, H.: Gynäkologie und Geburtshilfe, 2. Aufl. Stuttgart-New York: Schattauer 1975

LEBENSLAUF

Am 27. Dezember 1951 wurde ich, Klaus Dieter S t o c k , als Sohn des Walter Stock und der Hannelore Stock, geb. Scherer, in Einöd, Kreis Homburg/Saar geboren.

Im Frühjahr 1958 trat ich in die Volksschule Dellfeld/Pfalz ein und wechselte im ersten Halbjahr 1963 auf das Helmholtz-Gymnasium in Zweibrücken über. 1965 setzte ich meine Gymnasialzeit im Otto-Hahn-Gymnasium/Landau i.d.Pf. fort. Dort legte ich am 18. Mai 1971 das Abitur ab.

Im Wintersemester 1971/1972 nahm ich an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen mein Medizinstudium auf und bestand nach zwei Semestern die naturwissenschaftliche (29.9.1972), nach fünf Semestern die ärztliche Vorprüfung (29.3.1974).

Den ersten Abschnitt der bundeseinheitlichen ärztlichen Prüfung legte ich in Reutlingen am 29. August 1975 ab. Am 15. Januar 1977 heiratete ich in Tübingen Anna Josefa Nafz. Den zweiten Teil der ärztlichen Prüfung bestand ich am 31. März in Tübingen-Pfrondorf.

In der Universitäts - Hals - Nasen - Ohrenklinik Tübingen verbrachte ich vom 1. April bis zum 31. Juli 1977 den ersten Abschnitt des Internatsjahres. In der Zeit vom 1. August 1977 bis zum 31. März 1978 war ich auf der Inneren und Chirurgischen Abteilung des Robert-Bosch-Krankenhauses in Stuttgart.

Mit dem dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung beendete ich am 28.4.1978 mein Studium.